

Dirleise Colle

**MECANISMOS DE NEUROTOXICIDADE DOPAMINÉRGICA
TARDIA DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO PÓS-NATAL A
PESTICIDAS E LIPOPOLISSACARÍDEO: RELAÇÃO COM A
DOENÇA DE PARKINSON**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Doutor em
Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Farina

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Colle, Dirleise

Mecanismos de neurotoxicidade dopaminérgica tardia
decorrentes da exposição pós-natal a pesticidas e
lipopolissacarídeo: relação com a doença de Parkinson /
Dirleise Colle ; orientador, Marcelo Farina -
Florianópolis, SC, 2015.
159 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Doença de Parkinson. 3. Pesticidas. 4.
Inflamação. 5. Toxicidade Silenciosa. I. Farina, Marcelo.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Bioquímica. III. Título.

**"Mecanismos de neurotoxicidade dopaminérgica tardia decorrentes da
exposição pós-natal a pesticidas e lipopolissacarídeo: Relação com a doença de
Parkinson"**

Por

Dirleise Colle

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca
Examinadora (24/PPGBQA/2015) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica -
UFSC.



Prof(a). Dr(a). Carlos Peres Silva

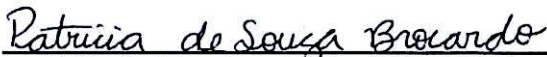
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:



Dr(a) Nelson Horácio Gabilan (Universidade Federal de Santa Catarina)

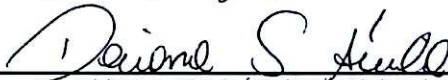
Presidente da banca



Dr(a) Patrícia de Souza Brocardo (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Cláudia Regina dos Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Daiana Silva de Ávila (Universidade Federal do Pampa)



Dr(a) Daniel Pens Gelain (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Florianópolis, 15 de dezembro de 2015.

Dedico este trabalho à minha família,
pelo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Geraldo e Dirte por todo apoio, dedicação e pela preocupação de sempre me proporcionar o melhor. Obrigado pela confiança que depositaram em mim durante esses anos. Sem vocês nada disso estaria acontecendo.

Agradeço ao meu noivo Jaelson que foi a primeira pessoa a me incentivar nesse caminho que escolhi. Obrigada pelo seu apoio, carinho, amor e por dividir comigo todos os momentos.

Ao meu orientador Professor Marcelo Farina pela oportunidade que me proporcionou em 2009 quando me aceitou em seu laboratório. Agradeço por todos os ensinamentos, pelo apoio e confiança no meu trabalho. Esses anos sob sua orientação foram sem dúvidas de muito crescimento e aprendizagem.

Aos colegas do laboratório LEN (Juliana, Aline, Viviane, Heloisa, Cinara, Marina, Sthéfani, Diones) por toda ajuda na execução dos experimentos, conversas, trocas de ideias e ótimas risadas ao embalo de um sertanejo universitário.

Aos colegas mais antigos do laboratório, Danúbia, Mariana, Alessandra, Renata, Eduardo, Débora. Obrigado pela ajuda nos experimentos, pelas nossas conversas, discussões sobre ciência ou outros assuntos. Saudade imensa de vocês e dos velhos tempos.

Um agradecimento especial à Danúbia e Aline que me ajudaram diretamente na execução dos protocolos *in vivo*. À Aline, minha aluna de iniciação científica na época, por me ajudar todos os dias com as injeções e depois nos experimentos. À Danúbia pela ajuda nos experimentos, pela troca de ideias, opiniões, amizade e por todo trabalho que fizemos juntas durante esses anos como dupla. Sinto sua falta no lab.

À Professora Sandra Ceccatelli que me aceitou em seu laboratório no Instituto Karolinska para a realização do doutorado sanduíche. Agradeço pela oportunidade de aprender novas técnicas, em especial os cultivos primários de células tronco neurais.

Ao Professor Marcelo Maraschin por ter proporcionado a execução das análises por cromatografia líquida de alta eficiência em seu laboratório.

Aos técnicos do LAMEB I e II, Bibiana, Vanessa, Denis, Chirle, Emily e Demétrio pela disponibilidade e auxílio na utilização dos equipamentos.

Aos professores do PPG em Bioquímica responsáveis pela minha formação acadêmica.

Ao apoio financeiro da CAPES e CNPq.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram na realização deste trabalho.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa de causa multifatorial, cujos sintomas manifestam-se normalmente na fase adulta tardia. Evidências recentes têm apontado para fatores ambientais do período perinatal (incluindo a exposição a pesticidas) e o processo inflamatório (causado por infecções virais ou bacterianas) como causadores de toxicidade direta aos neurônios dopaminérgicos. Ainda, estudos sugerem que exposições à toxicantes durante o período perinatal podem ser responsáveis por uma condição de *toxicidade silenciosa* com consequências tardias e duradouras no sistema dopaminérgico nigroestriatal, algumas das quais são evidenciadas apenas se este sistema sofrer um novo insulto na fase adulta. Embora tais evidências pareçam ser de grande importância para o entendimento da etiologia da doença de Parkinson idiopática, os mecanismos moleculares relacionados a tais fenômenos são desconhecidos. O objetivo do presente trabalho foi investigar os mecanismos relacionados à neurotoxicidade dopaminérgica tardia decorrente da exposição aos pesticidas paraquat (PQ) e maneb (MB) ou ao processo inflamatório induzido pela administração sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS) no sistema nigroestriatal em desenvolvimento relacionando-os com o eventual aumento da susceptibilidade a insultos neurotóxicos decorrentes da exposição aos pesticidas na fase adulta. Além disso, objetivou-se investigar o efeito da exposição aos pesticidas PQ e MB em cultivos de células tronco neurais sobre parâmetros de proliferação e diferenciação celular. Camundongos Swiss machos e fêmeas foram expostos a uma combinação dos pesticidas PQ e MB (PQ + MB) diariamente entre o dia pós-natal (PN) 5 ao 19. A exposição PN ao PQ + MB não causou mortalidade, alterações no peso corporal e nem alterações comportamentais no sistema motor dos animais, indicando ausência de toxicidade evidente. Entretanto, houve redução na atividade dos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, além de redução nos níveis dos marcadores dopaminérgicos tirosina hidroxilase (TH) e transportador de dopamina (DAT) no estriado. Ainda, houve uma diminuição significativa no número de neurônios TH e DAT positivos na substância negra pars compacta (SNpc), a qual pode estar relacionada ao mecanismo de toxicidade silenciosa. Essas alterações foram evidenciadas apenas nos camundongos machos. Quando esses animais foram reexpostos aos mesmos toxicantes na vida adulta foram observadas alterações motoras, bem como degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNpc, indicando um aumento na susceptibilidade dos animais machos à segunda

exposição na vida adulta. Por outro lado, camundongos Swiss machos e fêmeas expostos ao LPS (dia PN 5 e 10) apresentaram comprometimento motor significativo e aumento nos níveis de interleucinas inflamatórias no estriado. Quando esses animais foram expostos aos pesticidas na vida adulta, apenas os camundongos machos apresentaram alterações comportamentais que podem indicar um possível aumento na susceptibilidade dos animais. Por fim, foi avaliado o efeito da exposição ao PQ e MB em cultivos primários de células tronco neurais de ratos. A exposição aos pesticidas, especialmente o PQ ou a associação PQ + MB induziu uma redução na proliferação celular e um aumento na geração de espécies reativas. A redução na proliferação celular foi relacionada a alterações na expressão gênica de proteínas importantes na regulação do ciclo celular. Os dados indicam que exposições a toxicantes ambientais e o processo inflamatório durante períodos críticos do desenvolvimento cerebral podem levar a uma progressiva neurotoxicidade na vida adulta.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, paraquat e maneb, lipopolissacarídeo, *toxicidade silenciosa*.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a multifactorial neurodegenerative disorder with late-life onset. It has been hypothesized that PD could arise from events that occur early in development that have long-term but delayed adverse consequences for the nigrostriatal dopamine system, which may become evident only if the system undergoes further adult-related insult. Possible developmental events could include exposures to environmental neurotoxicants (including pesticides) and inflammatory process (induced by bacterial or viral infections). A "silent toxic" status has been hypothesized to be responsible for the enhanced adult susceptibility to environmental factors known to be involved in the induction of neurodegenerative disorders. However, the molecular mechanisms related with this phenomenon are unknown. Therefore, the objective of the present study was to investigate the mechanisms of late dopaminergic toxicity induced by exposures to the pesticides paraquat (PQ) and maneb (MB), as well as the inflammatory process induced by systemic lipopolysaccharide (LPS) administration on the nigrostriatal dopaminergic system during the early-postnatal development. In addition, we aimed to evaluate whether pesticides or LPS exposure during critical periods of development could enhance the vulnerability of the dopaminergic system to the toxicity elicited by subsequent re-exposure to the pesticide in adult life. Moreover, we aimed to investigate the effects of PQ and MB exposure in primary embryonic neural stem cells (NSC) on parameters related to cell proliferation and differentiation. Male and female Swiss mice were treated daily with a combination of PQ and MB (PQ + MB) from post-natal (PN) day 5 to 19. Pesticide exposure did not induce mortality; neither modify body weight nor mice motor function. However, PQ + MB exposure decreased the activity of mitochondrial complex I and II and reduced the levels of tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine transporter (DAT) in striatum. In addition, postnatal PQ+MB exposure decreased the number of TH and DAT positive neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc), which was related to the *silent toxicity* mechanism. These alterations were observed just in male mice. The findings indicate that the exposure to PQ + MB during PN period was able to produce permanent and progressive lesions of the nigrostriatal dopaminergic system and enhanced adult susceptibility of male mice to this pesticide. On the other hand, male and female mice exposed to LPS (at PN days 5 and 10) showed a significant motor deficits and an increase in striatal inflammatory interleukin levels. Male mice exposed developmentally to LPS and re-challenged as adults to PQ + MB showed

alterations in motor function, indicating a possible increase in the adult susceptibility of male mice to the pesticides. The effect of PQ and MB exposure was also investigated in NSC. Pesticides exposure, especially to PQ or PQ+MB reduced cell proliferation and induced an increase in reactive species generation. The decrease in cell proliferation was related to alterations in gene expression of important proteins modulating the cell cycle regulation. Taken together, these findings indicate that exposure to environmental toxicants and the inflammatory process during brain development might lead to a progressive neurotoxicity late in life.

Keywords: Parkinson's disease, paraquat and maneb, lipopolysaccharide, *silent toxicity*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Estrutura química do PQ e do MB e representação esquemática do ciclo redox do PQ..... | 30 |
| Figura 2: Mecanismo de toxicidade do PQ nos neurônios dopaminérgicos..... | 32 |
| Figura 3: Mecanismo de toxicidade do LPS nos neurônios dopaminérgicos..... | 36 |
| Figura 4: Linha do tempo descritiva para a exposição pós-natal ao PQ + MB..... | 46 |
| Figura 5: Linha do tempo descritiva para a reexposição ao PQ + MB na fase adulta..... | 47 |
| Figura 6: Linha do tempo descritiva para a exposição pós-natal ao LPS..... | 48 |
| Figura 7: Linha do tempo descritiva para a exposição ao PQ + MB na fase adulta em camundongos previamente expostos ao LPS no período PN..... | 49 |
| Figura 8: Desenho esquemático dos testes comportamentais..... | 51 |
| Figura 9: Linha do tempo para os tratamentos <i>in vitro</i> | 60 |
| Figura 10: Efeitos da exposição pós-natal ao PQ + MB sobre o peso corporal de camundongos durante o desenvolvimento..... | 66 |
| Figura 11: Efeitos da exposição pós-natal ao PQ + MB sobre a atividade locomotora e exploratória no campo aberto..... | 67 |
| Figura 12: Efeitos da exposição pós-natal ao PQ + MB sobre o desempenho motor no <i>rotarod</i> e no <i>pole test</i> | 67 |
| Figura 13: Efeitos da exposição pós-natal ao PQ + MB sobre a coordenação motora dos animais no <i>beam walking</i> | 68 |
| Figura 14: Exposição pós-natal ao PQ + MB diminui a atividade NADH desidrogenase e do complexo II em camundongos machos.... | 69 |
| Figura 15: Exposição pós-natal ao PQ + MB diminui o número de neurônios TH ⁺ e DAT ⁺ na SNpc de camundongos machos..... | 71 |
| Figura 16: Exposição pós-natal ao PQ + MB diminui a imunomarcção para TH e DAT no estriado de camundongos machos..... | 72 |
| Figura 17: Curva de sobrevivência dos animais expostos posnatalmente ao PQ + MB e reexpostos aos mesmos pesticidas na vida adulta..... | 74 |
| Figura 18: Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre a atividade locomotora e exploratória no campo aberto..... | 76 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Figura 19: Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre o desempenho motor no rotarod..... | 77 |
| Figura 20: Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre a coordenação motora dos animais no <i>beam walking</i> | 79 |
| Figura 21: Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre o desempenho dos animais no teste do <i>single pellet</i> | 80 |
| Figura 22: Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre a atividade NADH desidrogenase e do complexo II em camundongos.. | 81 |
| Figura 23: Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre o número de neurônios TH ⁺ na SN _{pc} | 83/84 |
| Figura 24: Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre o número de neurônios DAT ⁺ na SN _{pc} | 85/86 |
| Figura 25: Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre a imunomarcção para TH no estriado..... | 87 |
| Figura 26: Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre a imunomarcção para DAT no estriado..... | 88 |
| Figura 27: Curva de sobrevivência após a exposição pós-natal ao LPS em camundongos..... | 90 |
| Figura 28: Exposição pós-natal ao LPS diminui o peso corporal de camundongos durante o desenvolvimento..... | 91 |
| Figura 29: Exposição pós-natal ao LPS causa hiperatividade no campo aberto..... | 92 |
| Figura 30: Efeitos da exposição pós-natal ao LPS sobre a coordenação motora dos animais no <i>beam walking</i> | 92 |
| Figura 31: Efeitos da exposição pós-natal ao LPS sobre o desempenho motor no <i>rotarod</i> e no <i>pole test</i> | 93 |
| Figura 32: Efeitos da exposição pós-natal ao LPS sobre os níveis de marcadores inflamatórios no estriado..... | 95 |
| Figura 33: Curva de sobrevivência dos animais tratados posnatalmente com LPS e expostos ao PQ + MB na vida adulta..... | 96 |
| Figura 34: Efeitos da exposição ao PQ + MB na vida adulta em camundongos previamente expostos ao LPS sobre a atividade locomotora e exploratória no campo aberto..... | 98 |
| Figura 35: Efeitos da exposição ao PQ + MB na vida adulta em camundongos previamente expostos ao LPS sobre a coordenação motora no <i>rotarod</i> | 99 |
| Figura 36: Efeitos da exposição ao PQ + MB na vida adulta em camundongos previamente expostos ao LPS sobre a coordenação motora no <i>beam walking</i> | 101 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 37: Efeitos da exposição ao PQ + MB na vida adulta em camundongos previamente expostos ao LPS sobre o desempenho motor no <i>single pellet</i> | 102 |
| Figura 38: Efeitos da exposição ao PQ + MB na vida adulta em camundongos previamente expostos ao LPS sobre a atividade NADH desidrogenase e do complexo II em camundongos..... | 103 |
| Figura 39: Efeitos da exposição aos pesticidas sobre parâmetros de toxicidade em células tronco neurais..... | 105 |
| Figura 40: Efeitos da exposição ao PQ+MB sobre parâmetros de toxicidade e número total de células..... | 106 |
| Figura 41: A exposição ao PQ + MB diminui a proliferação das células tronco neurais..... | 108 |
| Figura 42: Representação esquemática do ciclo celular e a regulação da transição G1/S..... | 109 |
| Figura 43: A exposição ao PQ + MB diminui a expressão do RNAm das ciclinas D1 e D2..... | 110 |
| Figura 44: Efeitos da exposição ao PQ + MB sobre a expressão do RNAm das proteínas pRb1 e E2F1..... | 111 |
| Figura 45: Efeitos da exposição ao PQ + MB sobre a expressão do RNAm de inibidores de Cdks..... | 112 |
| Figura 46: Efeitos da exposição ao PQ + MB sobre parâmetros de estresse oxidativo em células tronco neurais..... | 113 |
| Figura 47: Efeitos da exposição ao PQ + MB em células tronco neurais sobre marcadores de diferenciação..... | 115 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Parâmetros de estresse oxidativo no estriado de camundongos expostos ao PQ + MB no período PN de desenvolvimento..... | 69 |
| Tabela 2: Marcadores inflamatórios no estriado de camundongos expostos ao PQ + MB no período PN de desenvolvimento..... | 70 |
| Tabela 3: Peso corporal dos animais expostos posnatalmente ao PQ + MB e reexpostos aos mesmos pesticidas na vida adulta..... | 74 |
| Tabela 4: Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre os níveis de dopamina no estriado..... | 89 |
| Tabela 5: Parâmetros de estresse oxidativo no estriado de camundongos expostos ao LPS no período pós-natal de desenvolvimento..... | 94 |
| Tabela 6: Atividade NADH desidrogenase e do complexo II no estriado de camundongos expostos ao LPS no período pós-natal de desenvolvimento..... | 94 |
| Tabela 7: Peso corporal dos animais expostos posnatalmente ao LPS e reexpostos aos pesticidas na vida adulta. | 97 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------|---------------------------------------------------------------|
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BHE | Barreira hematoencefálica |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| COMT | Catecol-orto-metiltransferase |
| COX2 | Cicloxygenase 2 |
| DAB | 3,3-diaminobenzidina |
| DAT | Transportador de dopamina |
| DG | Dia gestacional |
| DP | Doença de Parkinson |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementar |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DTNB | Ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzóico |
| ER | Espécies reativas |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| FGF | Fator de crescimento derivado de fibroblasto |
| GFAP | Proteína fibrilar ácida glial |
| GPx | Glutathione peroxidase |
| GR | Glutathione redutase |
| GSH | Glutathione |
| GSSG | Glutathione oxidada |
| IL-1 β | Interleucina-1 β |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzível |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IP | Iodeto de propídio |
| LAT | Transportador de aminoácidos neutros |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MAO-B | Monoamino oxidase B |
| MAPK | Proteína quinase dependente de mitógeno |
| MB | Maneb |
| MD2 | Proteína adaptadora acessória 2 |
| MDA | Malondialdeído |
| Mn | Manganês |
| MPTP | 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina |
| MTT | (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina |

| | |
|------------------------------|----------------------------------------------|
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato |
| NFκB | Fator nuclear kappa B |
| NPSH | Tióis não-proteicos |
| NO | Óxido nítrico |
| NSC | Células tronco neurais |
| O ₂ ^{•-} | Radical ânion superóxido |
| Oct3 | Transportador de cátion orgânico |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| PEP | Parkinsonismo posencefálico |
| PFA | Paraformaldeído |
| PN | Pós-natal |
| PQ | Paraquat |
| PQ ⁺ | Paraquat monocatión |
| PQ ²⁺ | Paraquat dicatión |
| RNA | Ácido ribonucleotídeo |
| RNA _m | RNA mensageiro |
| RT-PCR | Reação em cadeia da polimerase em tempo real |
| s.c. | Subcutâneo |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNpc | Substância negra <i>pars compacta</i> |
| SOD | Superóxido dismutase |
| TBARS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TH | Tirosina hidroxilase |
| TNF | Fator de necrose tumoral α |
| TLR-4 | <i>Toll-like receptor 4</i> |
| VTa | Área tegmental ventral |

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 23 |
| 1.1 DOENÇA DE PARKINSON..... | 23 |
| 1.2 EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS E A DOENÇA DE PARKINSON..... | 26 |
| 1.2.1 Paraquat e maneb..... | 28 |
| 1.3 INFLAMAÇÃO E A DOENÇA DE PARKINSON..... | 34 |
| 1.3.1 LPS como modelo de inflamação..... | 35 |
| 1.4 O CÉREBRO EM DESENVOLVIMENTO COMO UM ALVO DE TOXICIDADE: RELAÇÃO COM A DOENÇA DE PARKINSON..... | 37 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 41 |
| 3.OBJETIVOS..... | 43 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 43 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 43 |
| 4. METODOLOGIA..... | 45 |
| 4.1 ESTUDO <i>IN VIVO</i> | 45 |
| 4.1.1 Animais..... | 45 |
| 4.1.2 Protocolos Experimentais..... | 45 |
| 4.1.2.1 Desenho experimental I..... | 45 |
| 4.1.2.2 Desenho experimental II..... | 46 |
| 4.1.2.3 Desenho experimental III..... | 48 |
| 4.1.2.4 Desenho experimental IV..... | 48 |
| 4.1.3 Análises comportamentais..... | 49 |
| 4.1.3.1 Teste do campo aberto..... | 49 |
| 4.1.3.2 Teste <i>do rotarod</i> | 50 |
| 4.1.3.3 Teste <i>do beam walking</i> | 50 |
| 4.1.3.4 <i>Pole test</i> | 52 |
| 4.1.3.5 Teste do <i>single pellet</i> | 52 |
| 4.1.4 Análises bioquímicas..... | 53 |
| 4.1.4.1 Preparação tecidual para as análises bioquímicas..... | 53 |
| 4.1.4.2 Peroxidação lipídica..... | 54 |
| 4.1.4.3 Níveis de tióis não-proteicos (NPSH)..... | 54 |
| 4.1.4.4 Atividade das enzimas antioxidantes..... | 54 |
| 4.1.4.5 Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial..... | 55 |
| 4.1.4.6 Determinação de citosinas inflamatórias..... | 55 |
| 4.1.4.7 Determinação dos níveis de dopamina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 56 |
| 4.1.4.8 Dosagem de proteínas..... | 56 |
| 4.1.5 Análises imunoistoquímicas..... | 56 |
| 4.2 ESTUDO <i>IN VITRO</i> | 57 |
| 4.2.1 Animais..... | 57 |

| | | |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.2 | Preparação dos cultivos primários de células tronco neurais..... | 58 |
| 4.2.3 | Protocolos experimentais in vitro..... | 59 |
| 4.2.4 | Ensaio de viabilidade e morte celular..... | 60 |
| 4.2.5 | Determinação dos níveis de espécies reativas..... | 61 |
| 4.2.6 | Determinação do número de células..... | 61 |
| 4.2.7 | Análise imunocitoquímica..... | 62 |
| 4.2.8 | PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)..... | 62 |
| 4.3 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 63 |
| 5. | RESULTADOS..... | 65 |
| 5.1 | CAPÍTULO I - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AOS PESTICIDAS PQ + MB..... | 65 |
| 5.1.1 | A exposição pós-natal de camundongos aos pesticidas PQ + MB causa toxicidade dopaminérgica?..... | 65 |
| 5.1.2 | Camundongos expostos posnatalmente ao PQ e MB são mais suscetíveis a uma segunda exposição aos mesmos pesticidas na vida adulta?..... | 73 |
| 5.2 | CAPÍTULO II - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO LPS..... | 89 |
| 5.2.1 | A exposição pós-natal de camundongos ao LPS causa toxicidade dopaminérgica?..... | 89 |
| 5.2.2 | Camundongos expostos posnatalmente ao LPS são mais susceptíveis a uma exposição aos pesticidas PQ e MB na vida adulta?..... | 95 |
| 5.3 | CAPÍTULO III - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO PQ + MB EM CULTIVO PRIMÁRIO DE CÉLULAS TRONCO NEURAI..... | 104 |
| 6. | DISCUSSÃO..... | 117 |
| 7. | CONCLUSÕES..... | 129 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 131 |
| | APÊNDICE A - Sequência dos primers utilizados nas análises de PCR quantitativo em tempo real..... | 151 |
| | APÊNDICE B - Análise de variância com o fator sexo como variável independente - Protocolo experimental I..... | 153 |
| | APÊNDICE C - Análise de variância com o fator sexo como variável independente - Protocolo experimental II..... | 155 |
| | APÊNDICE D - Análise de variância com o fator sexo como variável independente - Protocolo experimental III..... | 157 |
| | APÊNDICE E - Análise de variância com o fator sexo como variável independente - Protocolo experimental IV..... | 159 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa cujos sintomas manifestam-se geralmente na fase adulta tardia. Aproximadamente 1 % da população mundial é acometida pela DP, aumentando para 5% em indivíduos com idade igual ou superior a 85 anos (Shastry, 2001). De uma maneira geral, possui prevalência de aproximadamente 173 casos para cada 100.000 indivíduos entre 55 - 64 anos, aumentando a prevalência com o aumento da idade (Pringsheim, Jette *et al.*, 2014).

Foi inicialmente descrita pelo médico inglês James Parkinson (1755-1824) em 1817, que a princípio a chamou de “paralisia agitante” (*shaking palsy*, do inglês). Para Parkinson, a doença tinha características motoras, como o tremor de repouso e alterações da marcha, e não motoras, como a incontinência urinária (Parkinson, 2002). Posteriormente, o neurologista francês Jean-Martin Charcot (1825-1893) foi o responsável por batizar a doença de “doença de Parkinson”, tal qual a conhecemos atualmente, homenageando James Parkinson. Charcot, trabalhando no Hospital de Salpêtrière (Paris, França), contribuiu muito no entendimento desta doença, principalmente por diferenciá-la da esclerose múltipla (Goetz, 2002).

A DP tem como principal característica neuropatológica a lesão de neurônios localizados na substância negra *compacta* (SNc, células do sistema dopaminérgico nigroestriatal), que enviam projeções para os gânglios da base e cuja degeneração provoca uma redução dos níveis de dopamina no estriado (Blandini, Nappi *et al.*, 2000). Outra característica neuropatológica da DP é o aparecimento de inclusões eosinofílicas citoplasmáticas denominadas corpos de Lewy, formadas principalmente pelo acúmulo das proteínas α -sinucleína e ubiquitina (Hagan, Middlemiss *et al.*, 1997; Blandini, Nappi *et al.*, 2000). Estas inclusões parecem se acumular em neurônios que estão em processo de degeneração, particularmente em neurônios dopaminérgicos da SNc, sendo utilizadas como um marcador histopatológico da DP (Hagan, Middlemiss *et al.*, 1997).

Desde a sua descrição inicial, a DP vem sendo caracterizada como um distúrbio do movimento, sendo o seu diagnóstico baseado na presença de dois ou mais sintomas motores (ex: rigidez, bradicinesia, tremor e perda do reflexo postural). Entretanto, os pacientes parkinsonianos somente desenvolvem as alterações motoras quando

cerca de 70% dos neurônios da SNc encontram-se degenerados e os níveis estriatais de dopamina são reduzidos cerca de 70-80% (Riederer e Wuketich, 1976; Braak, Ghebremedhin *et al.*, 2004). Além dos sintomas motores clássicos, a DP também é caracterizada por sintomas não motores tais como distúrbios olfativos, distúrbios do sono REM, depressão, ansiedade e perturbações urinárias e sexuais (Ziemssen e Reichmann, 2007).

Devido a essa gama de sintomas associados e à característica progressiva da doença, o tratamento da DP é considerado muito complexo. Na realidade, não existe um tratamento definitivo para evitar ou retardar a progressão da doença. As terapias farmacológicas disponíveis, ou até mesmo a intervenção cirúrgica, são tratamentos paliativos e são capazes apenas de controlar ou melhorar os sintomas temporariamente.

Dentre as terapias farmacológicas está a levodopa, que pode ser associada com os inibidores da dopa-descarboxilase, carbidopa ou benserazida; agonistas da dopamina e inibidores de enzimas do metabolismo da dopamina como a monoamino oxidase B (MAO-B) e a catecol-orto-metiltransferase (COMT); além de drogas não dopaminérgicas como anticolinérgicos e amantadina (para o tratamento dos efeitos anti-glutamatérgicos) (Singh, Pillay *et al.*, 2007). Entretanto, dentre as terapias disponíveis, a levodopa (3,4-hidroxifenilalanina, um precursor da dopamina), que foi a primeira droga dopaminérgica a ser desenvolvida, ainda permanece como a mais efetiva para o tratamento dos sintomas motores clássicos da DP (Lewitt, 2015; Ossig e Reichmann, 2015). Com o intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes, outras terapias também podem ser utilizadas no tratamento dos sintomas não-motores como depressão, constipação, disfunção urinária, dentre outros (Sprenger e Poewe, 2013; Todorova, Jenner *et al.*, 2014).

O envelhecimento é o principal fator de risco no desenvolvimento da DP. Entretanto, a susceptibilidade genética e fatores de risco ambiental têm sido investigados. Cerca de 5-10% dos casos da doença possuem característica genética e são chamadas de DP familiar. Nos últimos anos, identificou-se diversos genes de herança autossômica dominante ou recessiva cujas mutações contribuem para a forma familiar da doença, incluindo, por exemplo, os genes da α -sinucleína, parkina, DJ-1, LRRK2 e PINK1 (Lesage e Brice, 2009; Corti, Lesage *et al.*, 2011). Entretanto, apesar de haver essas formas da DP que são de origem genética, a doença é primariamente idiopática ou esporádica (cerca de 90% dos casos), sendo provavelmente resultado de efeitos

combinados de múltiplos fatores, incluindo predisposição, envelhecimento, infecção bacteriana ou viral e exposições a contaminantes ambientais, especialmente metais pesados e pesticidas (Tanner e Langston, 1990; Pan-Montojo e Reichmann, 2014). Desta forma, a DP é considerada uma doença multifatorial com ambos os fatores, genéticos e ambientais, influenciando na sua progressão.

O completo entendimento das alterações bioquímicas que levam ao processo neurodegenerativo na DP permanece elusivo. Entretanto, é postulado que o estresse oxidativo, resultante da elevada produção de espécies reativas que excede a capacidade antioxidante celular, contribui para o dano celular oxidativo de macromoléculas, induzindo morte celular. Esta hipótese é baseada no fato de que espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas durante o metabolismo oxidativo da dopamina (Graham, 1978), as quais expõem os neurônios dopaminérgicos da SNc a um estresse oxidativo bastante elevado. Outros fatores que também contribuem para o estresse oxidativo são: a elevada taxa de metabolismo aeróbio cerebral, a auto-oxidação de dopamina e seus metabólitos, produzindo quinonas e semi-quinonas capazes de interagir com grupos sulfidrílicos de proteínas e da glutatona e os elevados níveis de ferro (Fe) na SNc, contribuindo para a geração de radical hidroxil através da reação de Fenton (Jenner, 2003; Andersen, 2004; Barnham, Masters *et al.*, 2004). Análises *post mortem* dos encéfalos de pacientes com DP confirmaram a ocorrência de estresse oxidativo pelo aumento da peroxidação de lipídeos (Dexter, Carter *et al.*, 1989; Dexter, Holley *et al.*, 1994) e diminuição dos níveis de glutatona (Sofic, Lange *et al.*, 1992; Sian, Dexter *et al.*, 1994). Acompanhada do estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial parece também ser um fator importante na patogênese da doença. Estudos mostram inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial na SNc de pacientes com a DP (Schapira, Cooper *et al.*, 1990). A inibição do complexo I resulta no aumento da produção de EROs, exacerbando ainda mais a disfunção mitocondrial.

Ainda, a morte neuronal na DP também parece estar associada a uma neuroinflamação crônica controlada primariamente pela micróglia. Ativação microglial foi observada na SNc de pacientes com a DP idiopática ou familiar (Mcgeer, Itagaki *et al.*, 1988). A micróglia pode ser ativada em resposta a toxinas provenientes do ambiente e a proteínas endógenas, liberando ERO que podem causar neurotoxicidade (Taylor, Main *et al.*, 2013). Embora os estudos acima-mencionados suportam um importante papel para o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação na degeneração neuronal na DP, ainda há controvérsias

sobre o fato destes fenômenos serem eventos primários ou secundários relacionado à patogênese da doença.

Entretanto, atualmente existe uma hipótese que aponta para a agregação pré-sináptica de α -sinucleína como um evento primário no processo de neurodegeneração na DP idiopática (Schulz-Schaeffer, 2015). A α -sinucleína é uma proteína localizada nos terminais pré-sinápticos e possui uma função importante na liberação de neurotransmissores, especialmente a dopamina (Sidhu, Wersinger *et al.*, 2004; Yavich, Tanila *et al.*, 2004). A formação de micro-agregados de α -sinucleína teria como consequência a diminuição na liberação de neurotransmissores e consequente degeneração de terminais dendríticos pós-sinápticos. Além disso, os micro-agregados poderiam influenciar na função mitocondrial e induzir um aumento na produção de ERO, como eventos secundários no mecanismo de neurodegeneração (Schulz-Schaeffer, 2012). Os neurônios podem detoxificar esses microagregados de α -sinucleína através de um mecanismo relacionado à formação de agregossomos, que posteriormente darão origem aos corpos de Lewy (Olanow, Perl *et al.*, 2004). Nesta hipótese, a morte neuronal pode ocorrer em qualquer momento no processo de neurodegeneração, mas sempre como um evento secundário à agregação da α -sinucleína.

1.2 EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS E A DOENÇA DE PARKINSON

Os pesticidas são compostos amplamente utilizados na agricultura e responsáveis por inúmeros casos de intoxicações em humanos. A exposição a esses compostos ocorre durante a sua aplicação, mas também pelo contato com lavouras tratadas com esses toxicantes ou ainda pela ingestão de alimentos ou água contaminados.

No Brasil a utilização de pesticidas nos diversos tipos de culturas vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Enquanto o mercado mundial de agrotóxicos cresceu cerca 93% nos últimos 10 anos, o crescimento no mercado brasileiro atingiu 190%, ultrapassando os Estados Unidos e assumindo o posto de maior consumidor mundial de agrotóxicos (ANVISA, 2012). Em 2011 as vendas de agrotóxicos no Brasil atingiram 8,5 bilhões de dólares, principalmente para lavouras de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar (SINDAG, 2012). Sendo que dos pesticidas comercializados no mercado nacional, cerca de 45 % são herbicidas, 14 % fungicidas e 12 % inseticidas (ANVISA, 2012). Porém, entre os cinquenta agrotóxicos mais utilizados nas lavouras do país, pelo menos 22 são proibidos em países da União Europeia por serem enquadrados na escala máxima de toxicidade (Carneiro et al., 2015).

Conforme mencionado anteriormente, os pesticidas têm sido propostos como importantes fatores relacionados à etiologia da DP idiopática, tanto em estudos epidemiológicos quanto experimentais (Thiruchelvam, Brockel *et al.*, 2000; Freire e Koifman, 2012). A literatura epidemiológica mostra diversos estudos que relacionam a exposição aos pesticidas e a doença de Parkinson (Petrovitch, Ross *et al.*, 2002; Elbaz, Clavel *et al.*, 2009; Tanner, Ross *et al.*, 2009; Tanner, Kamel *et al.*, 2011). Esses incluem, basicamente, relatórios de caso e estudos de coorte. A maioria desses trabalhos relatam uma associação entre a exposição a pesticidas e a DP, apesar desses achados serem muitas vezes contestados devido a limitações metodológicas dos próprios estudos (Van Der Mark, Vermeulen *et al.*, 2014). Essas limitações incluem principalmente a falta de informações acerca da duração e extensão das exposições, bem como a dificuldade de identificar os tipos de pesticidas usados no momento da intoxicação (Berry, La Vecchia *et al.*, 2010).

O interesse em estudar a relação entre a exposição a pesticidas e o desenvolvimento da DP surgiu nos anos 80 com a descoberta de que a exposição ao MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina - composto estruturalmente similar ao herbicida paraquat) resultava em parkinsonismo crônico e degeneração de neurônios dopaminérgicos em humanos (Langston e Ballard, 1983). Desde então o paraquat tem sido o pesticida mais estudado como um possível neurotóxico, suportando a ideia de associação entre a exposição aos pesticidas e a DP. Além do paraquat, estudos em modelos experimentais sugerem que pesticidas como rotenona, maneb e dieldrin estão relacionados com degeneração de neurônios dopaminérgicos e apoptose (Thiruchelvam, Richfield *et al.*, 2000; Song, Kanthasamy *et al.*, 2010; Murakami, Miyazaki *et al.*, 2014). Esses estudos também mostram que quando ocorre a exposição a uma combinação desses tóxicos ambientais, podem ser observadas alterações neuropatológicas além daquelas observadas quando esses compostos são utilizados individualmente (Thiruchelvam, Brockel *et al.*, 2000; Barlow, Thiruchelvam *et al.*, 2003).

Os mecanismos propostos para o papel da exposição a pesticidas no desenvolvimento do Parkinson incluem basicamente estresse oxidativo, interferência nos transportadores de dopamina, disfunção mitocondrial, indução de fibrilação da α -sinucleína e inflamação (Brown, Rumsby *et al.*, 2006; Baltazar, Dinis-Oliveira *et al.*, 2014). Entretanto, esses mecanismos ainda não são bem estabelecidos e estudos nesta área são de grande relevância para o entendimento do papel dos pesticidas na DP.

1.2.1 Paraquat e Maneb

O paraquat (*N,N'*-dimetil-4,4'-bipiridina dicloreto, PQ) (Figura 1A) é um herbicida caracterizado quimicamente como um composto de amônio quaternário com dois anéis covalentemente ligados que interfere na fotossíntese (fotossistema I) e causa danos nas plantas pela produção de ERO (Calderbank, 1968). Produzido primeiramente em 1961, o PQ é atualmente utilizado em diversos países em diferentes tipos de lavouras, na produção de frutas, vegetais e cana-de-açúcar. Baseado na sua alta toxicidade e na ausência de antídoto, foi totalmente removido do mercado na União Europeia em 2007 e possui uso restrito nos Estados Unidos. Porém, no Brasil, ainda está entre os herbicidas mais utilizados na agricultura.

As exposições ao PQ ocorrem basicamente por contato dérmico e ocular, inalação, ingestão acidental ou nas tentativas de suicídio. A pele é a principal forma de exposição ocupacional ao PQ. Ele é pobremente absorvido pela pele íntegra, porém sua penetração é aumentada consideravelmente na presença de lesões, o que ocorre pelo próprio contato com o pesticida (Wesseling, Van Wendel De Joode *et al.*, 2001). O PQ é também pouco absorvido via trato gastrointestinal, apenas 5-10 % de uma única dose administrada em ratos pela via oral é absorvida. Sua excreção ocorre pela urina e fezes, sendo excretado em torno de 45 % após 48 horas da sua administração (Chen, Zhang *et al.*, 2007).

O PQ ganhou atenção considerável pela literatura devido à significativa toxicidade e alta mortalidade em exposições agudas em humanos, bem como devido a sua similaridade ao MPTP, levando a comunidade científica a especular o PQ como uma potencial neurotoxina dopaminérgica. Atualmente, muitos estudos epidemiológicos relatam associação entre a exposição ao PQ e o desenvolvimento da DP (Liou, Tsai *et al.*, 1997; Tanner, Ross *et al.*, 2009; Tanner, Kamel *et al.*, 2011). Por outro lado, outros dados na literatura contestam essa associação entre o PQ e a DP (Berry, La Vecchia *et al.*, 2010; Mandel, Adami *et al.*, 2012; Breckenridge, Sturgess *et al.*, 2013).

Devido a suas propriedades químicas, acreditava-se que o PQ não seria capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Naylor, Widdowson *et al.*, 1995). Porém, em 2001, Shimizu e colaboradores mostraram, através de técnicas de microdiálise, que o PQ poderia chegar ao cérebro de ratos após administração subcutânea, e que esta penetração não era resultado de danos na barreira hematoencefálica (BHE), mas que o PQ era capaz de entrar no cérebro por meio do

sistema de transportadores de aminoácidos neutros (LAT) (Shimizu, Ohtaki *et al.*, 2001). Estudos posteriores confirmaram esses achados e, além disso, demonstraram que mudanças na função da barreira podem ser críticas na entrada do PQ no cérebro. Muitos estudos em animais mostram que a entrada do PQ no SNC é dependente da idade, sendo esta favorecida em cérebros neonatais ou muito jovens (duas semanas de idade) ou em idade avançada (12-24 meses), quando comparado com animais adultos (2-3 meses) (Corasaniti, Defilippo *et al.*, 1991; Corasaniti, Strongoli *et al.*, 1992). Um recente estudo mostrou que a concentração estimada de PQ no cérebro após uma única administração (dose de 10 mg/kg em camundongos C57/BL6) foi de 2,8 μM , o que representa aproximadamente 0,3 % da dose administrada, sendo esta concentração 10 vezes menor que a encontrada nos tecidos periféricos (Breckenridge, Sturgess *et al.*, 2013). Ainda, a concentração de PQ no estriado parece ser similar aos níveis encontrados em outras regiões cerebrais como córtex, hipocampo e cerebelo (Prasad, Tarasewicz *et al.*, 2009).

Apesar da pequena porcentagem de PQ que chega ao sistema nervoso central (SNC), a literatura tem relatado um efeito cumulativo do pesticida no cérebro. Com um tempo de meia vida de aproximadamente um mês, o PQ parece persistir no cérebro por longos períodos, porém sua concentração, após repetidas exposições, parece atingir um *plateau* após 18 administrações em camundongos (dose de 10 mg/kg, 2 ou 3x por semana, intraperitoneal) (Prasad, Tarasewicz *et al.*, 2009; Breckenridge, Sturgess *et al.*, 2013).

O PQ é altamente tóxico para os pulmões, fígado, rins e coração. Sua toxicidade é mediada pela indução de um ciclo redox na presença de uma diaforase (enzima que transfere um elétron do NAD(P)H, como as NADPH-oxidases, óxido nítrico sintase e complexo I) com subsequente produção de radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Day, Patel *et al.*, 1999). Primeiramente o PQ dicátion (PQ^{2+}) aceita um elétron de um agente redutor para formar o PQ monocátion (PQ^+), que reage rapidamente com o oxigênio molecular ($K \sim 7,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) sendo reoxidado para sua forma catiônica (PQ^{2+}) com a formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Figura 1C). As mitocôndrias parecem ter papel importante nesta formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Estudos mostram que o PQ^{2+} pode atravessar a membrana mitocondrial interna através de carreadores e ser reduzido pelo complexo I mitocondrial (NADH desidrogenase) com subsequente formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Cocheme e Murphy, 2008). Além do complexo I, outra enzima importante na indução de estresse oxidativo pelo PQ é a NADPH oxidase (complexo enzimático produtor de $\text{O}_2^{\bullet-}$). Estudos

mostram que a inibição da NADPH oxidase por apocinina (inibidor clássico da enzima) reduz o estresse oxidativo e a morte neuronal induzidos pelo PQ (Cristovao, Choi *et al.*, 2009).

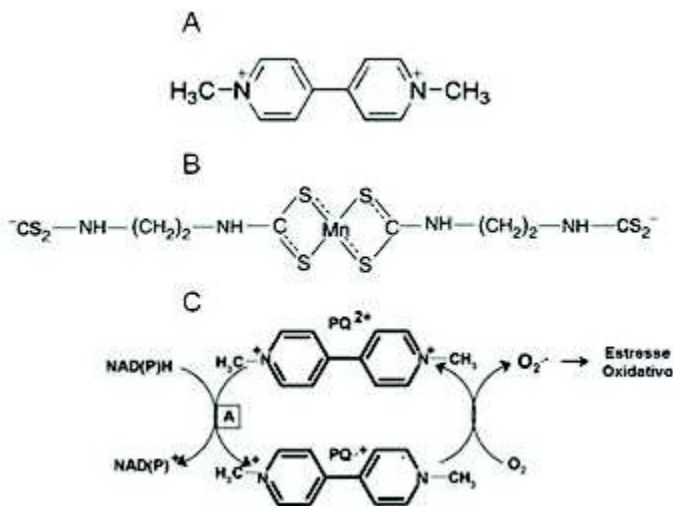


Figura 1: Estrutura química do PQ (A), estrutura química do MB (B) e representação esquemática do ciclo redox do PQ (C). A letra A no esquema (C) representa uma enzima que pode ser a NADPH-oxidase, óxido nítrico sintase e complexo I. Adaptado de (Dinis-Oliveira, Remiao *et al.*, 2006).

O papel do estresse oxidativo na toxicidade induzida pelo PQ tem sido demonstrado em modelos *in vivo* e *in vitro*. A exposição ao paraquat causa depleção de glutatona na substância negra de camundongos (Kang, Gil *et al.*, 2009), aumento nos níveis de produtos de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (Yang e Tiffany-Castiglioni, 2005). Além do estresse oxidativo, outras vias também têm sido propostas, como disfunção mitocondrial, inflamação, apoptose, autofagia, bem como indução de aumento de α -sinucleína (Manning-Bog, McCormack *et al.*, 2002; Moretto e Colosio, 2011; Baltazar, Dinis-Oliveira *et al.*, 2014).

Muitos estudos sugerem que a administração sistêmica de PQ pode causar dano neuronal e sintomas do tipo parkinsonianos em modelos experimentais (camundongos e ratos). A injeção intraperitoneal subcrônica de paraquat (10 mg/kg), em modelos animais em roedores, induz neurodegeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* (SNpc) pela diminuição do número de

neurônios positivos para a enzima tirosina hidroxilase (TH^+ - enzima da via de síntese de dopamina utilizado como marcador de neurônios dopaminérgicos) (McCormack, Thiruchelvam *et al.*, 2002) e déficit do sistema motor (Mitra, Chakrabarti *et al.*, 2011).

O mecanismo de toxicidade do PQ nos neurônios dopaminérgicos parece depender da sua entrada nesses neurônios. Rappold e colaboradores em 2011 relataram que o PQ^+ pode ser substrato do transportador de dopamina (DAT) e ser capaz de entrar nos neurônios dopaminérgicos. Esses autores sugerem que o PQ^{2+} pode ser reduzido extracelularmente pela NADPH oxidase da micróglia a PQ^+ , que seria capaz de entrar nos neurônios dopaminérgicos via DAT, desencadeando o ciclo redox nesses neurônios. Além disso, estes mesmos autores mostraram que o PQ^+ pode também ser substrato para os transportadores catiônicos orgânicos como o Oct3 (transportador bidirecional altamente expresso em astrócitos e neurônios gabaérgicos), mediando, juntamente com o DAT, toxicidade nigroestriatal (Rappold, Cui *et al.*, 2011). Na figura 2 está representado um desenho esquemático do mecanismo de toxicidade dopaminérgica induzido por PQ.

Além do estresse oxidativo, a neuroinflamação parece ser um mecanismo relevante na toxicidade do PQ nos neurônios dopaminérgicos. Estudos relatam que o PQ é capaz de induzir a micróglia após uma única injeção, antes mesmo de ocorrer morte neuronal (Purisai, McCormack *et al.*, 2007). A micróglia pode ser também uma fonte de ERO, visto que o PQ desencadeia seu ciclo redox nessas células via NADPH oxidase (Peng, Stevenson *et al.*, 2009). Em conjunto, estes mecanismos contribuem para a toxicidade dopaminérgica induzida pelo paraquat.

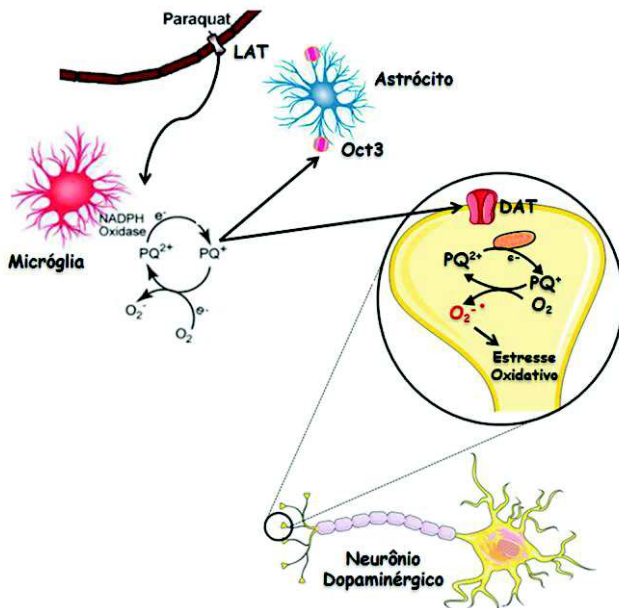


Figura 2: Mecanismo de toxicidade do PQ nos neurônios dopaminérgicos.

Após sua entrada no SNC via LAT o PQ na sua forma dicátion (PQ^{2+}) pode ser reduzido pela enzima NADPH oxidase presente na microglia à PQ monocatión (PQ^+), que por sua vez seria capaz de entrar nos neurônios dopaminérgicos via DAT, desencadeando o ciclo redox com a produção de radical ânion superóxido e consequentemente estresse oxidativo culminando com a morte neuronal. PQ: paraquat; LAT: transportador de aminoácidos neutros; SNC: sistema nervoso central; DAT: transportador de dopamina. Adaptado de (Rappold, Cui *et al.*, 2011).

Outro pesticida que tem recebido atenção como fator de risco para a DP é o fungicida maneb (Manganês etilenobisditiocarbamato, MB) (Figura 1B). O MB é um membro da família dos ditiocarbamatos, compostos amplamente utilizados mundialmente. Devido à presença de manganês (Mn) na sua composição, o MB foi considerado um candidato a fator de risco para a DP (Ferraz, Bertolucci *et al.*, 1988; Morato, Lemos *et al.*, 1989). Ferraz e colaboradores hipotetizaram que as alterações motoras induzidas pelo MB (30 mg/kg, intraperitoneal) poderiam ser devido a alterações na via nigroestriatal (Ferraz, Bertolucci *et al.*, 1988). Posteriormente, estes achados foram confirmados, onde foi demonstrado que os efeitos tóxicos do MB não estavam associados com a presença do Mn na sua estrutura, mas sim que a sua cadeia orgânica

era relevante para os efeitos observados (Barlow, Thiruchelvam *et al.*, 2003).

A exposição ao MB em roedores tem sido descrita por reduzir a atividade locomotora e por causar agressividade nos animais (Morato, Lemos *et al.*, 1989). Os mecanismos envolvidos na toxicidade do MB não estão totalmente elucidados, mas a literatura mostra que este composto é capaz de induzir seletiva degeneração de neurônios dopaminérgicos, efluxo de dopamina no estriado, disfunção no sistema antioxidante da glutathione (Barlow, Lee *et al.*, 2005), e inibição do complexo III da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Zhang, Fitsanakis *et al.*, 2003). Além disso, o MB potencializa a toxicidade do MPTP sobre o sistema locomotor de roedores (Takahashi, Rogerio *et al.*, 1989) e é capaz de induzir um aumento no conteúdo tecidual de [14C]PQ, sugerindo que os compostos ditiocarbamatos podem aumentar a neurotoxicidade de outros xenobióticos (Barlow, Thiruchelvam *et al.*, 2003).

Baseados nesses resultados, estudos *in vitro* e *in vivo* começaram a investigar o efeito da associação dos pesticidas PQ e MB (PQ + MB). De fato, a combinação dos pesticidas PQ e MB em roedores causa efeitos aparentemente mais severos do que aqueles observados quando os toxicantes são utilizados individualmente (Thiruchelvam, Brockel *et al.*, 2000; Thiruchelvam, Richfield *et al.*, 2000). Esses estudos passaram a atrair atenção uma vez que exposições a agentes tóxicos como os pesticidas, na maioria das vezes, não ocorrem de maneira isolada, mas em conjunto com outros fatores de risco, incluindo outros toxicantes ambientais. Neste contexto, a hipótese dos múltiplos *hits* presume que quando o sistema dopaminérgico é exposto a um fator isolado (um único toxicante agindo num alvo particular), através de mecanismos compensatórios, o sistema é capaz de responder a este insulto. Entretanto, quando múltiplos alvos do sistema dopaminérgico são atacados (exposição a mais de um toxicante ou exposição a um toxicante juntamente com outro fator de risco), o sistema pode não conseguir responder de maneira adequada contra estes insultos, levando a um dano cumulativo (Cory-Slechta, 2005). Essa hipótese atraiu maior relevância, pois a exposição concomitante ao PQ e MB é um fenômeno frequente em agricultores, devido à co-utilização destes compostos na agricultura (Costello, Cockburn *et al.*, 2009).

In vivo, o modelo experimental da combinação dos pesticidas foi desenvolvido em camundongos adultos jovens pela administração associada das doses de 10 mg/kg de PQ e 30 mg/kg de MB (PQ + MB), resultando num fenômeno de DP, como por exemplo redução da atividade

locomotora, diminuição de neurônios TH⁺ na SNpc e dos níveis de dopamina no estriado (Thiruchelvam, Brockel *et al.*, 2000; Thiruchelvam, Richfield *et al.*, 2000). Os efeitos tóxicos da associação PQ + MB parecem ser dependentes da idade, visto que os danos induzidos pelo tratamento com os pesticidas foram superiores em animais “velhos” quando comparado a animais jovens (Thiruchelvam, McCormack *et al.*, 2003).

1.3 INFLAMAÇÃO E A DOENÇA DE PARKINSON

A primeira evidência do envolvimento da inflamação na progressão da DP surgiu na década de 80, quando foi demonstrado a presença de micróglia ativada na SNpc de um paciente parkinsoniano (Mcgeer, Itagaki *et al.*, 1988). Desde então, uma grande quantidade de estudos clínicos e em modelos animais foram desenvolvidos e apontam para o papel da ativação microglial e aumento dos níveis de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e ERO na patogênese da DP (Hunot, Boissiere *et al.*, 1996; Duke, Moran *et al.*, 2007; Barcia, Ros *et al.*, 2011; Iravani, Sadeghian *et al.*, 2012; Luchtman, Meng *et al.*, 2012).

A micróglia parece exercer um papel importante na neuroinflamação na DP. Fisiologicamente, a sinalização do sistema imunológico, mediada pelas células da micróglia, é de grande importância para a manutenção da homeostase, neurogênese, plasticidade sináptica e para a formação dos circuitos (Bilbo & Schwarz 2012, Garay & McAllister 2010). No cérebro adulto, a micróglia mantém, predominantemente, seu estado ramificado com baixa expressão de citocinas inflamatórias. Entretanto, quando ativas (por toxinas, patógenos ou neurônios em degeneração), essas células respondem rapidamente alterando sua morfologia e aumentando a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (Ransohoff e Perry, 2009).

Enquanto uma discreta ativação tem efeitos benéficos, sua ativação crônica em resposta ao dano neuronal resulta em degeneração e morte de células viáveis. Essa ativação da micróglia em resposta à morte neuronal é conhecida como microgliose reativa e é uma característica de doenças neurodegenerativas como a DP (Perry, Nicoll *et al.*, 2010). Esse mecanismo é especialmente pertinente na DP, uma vez que os neurônios dopaminérgicos na SNpc são particularmente sensíveis a neurotoxicidade mediada pela micróglia devido a alta densidade dessas células nesta região cerebral. Quando ativada, a micróglia libera uma gama de citocinas inflamatórias como interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8,

IL-12, IL-18), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon γ , entre outros mediadores inflamatórios. Esses mediadores foram encontrados em cérebros, no soro e no fluido cerebrospinal de pacientes com a DP (Boka, Anglade *et al.*, 1994; Mogi, Harada *et al.*, 1994; Mount, Lira *et al.*, 2007). Além dos mediadores inflamatórios, a micróglia também é importante na produção de ERO. Como comentado anteriormente, evidências sugerem que tanto a neuroinflamação como o estresse oxidativo contribuem para a degeneração neuronal na DP (Drechsel e Patel, 2008; Taylor, Main *et al.*, 2013).

Por outro lado, evidências epidemiológicas sugerem uma correlação entre eventos inflamatórios sistêmicos e a progressão da DP (Perry, 2010; Ferrari e Tarelli, 2011). Esta associação foi primeiramente estabelecida no final da primeira Guerra Mundial (1914 - 1918) onde uma pandemia de Influenza A do tipo H1N1 culminou com um dramático aumento nos casos de parkinsonismo posencefalítico (PEP - sintomatologia similar às observadas na DP como rigidez e bradicinesia, mas com ausência de corpos de Lewy) (Rail, Scholtz *et al.*, 1981; Jang, Boltz *et al.*, 2009). Indivíduos nascidos nesta época tiveram um aumento de 2 a 3 vezes no risco de desenvolver DP (Jang, Boltz *et al.*, 2009). Desde então, infecções virais ou bacterianas têm sido consideradas fatores de risco para a DP.

Neste contexto, sabe-se que uma resposta inflamatória sistêmica, que resulta na produção de citocinas em nível periférico, pode afetar o SNC, visto que esses mediadores inflamatórios podem se comunicar com os neurônios no cérebro, por diversos mecanismos, mesmo na ausência de danos na barreira hematoencefálica (Perry, 2004). A passagem de citocinas através da BHE pode causar dano considerável ao tecido neuronal.

1.3.1 LPS como modelo de inflamação

O papel da inflamação sistêmica no desenvolvimento da doença de Parkinson ganhou maior atenção com a utilização de injeção sistêmica ou central (mais precisamente na substância negra) de lipopolissacarídeo (LPS) como modelo experimental da DP em roedores. O LPS é uma endotoxina proveniente da parede de bactérias gram negativas e um potente ativador da micróglia. É utilizado para mimetizar uma infecção bacteriana em modelos animais, sendo atualmente considerado um modelo experimental clássico de inflamação e neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos na SNpc (Herrera, Castano *et al.*, 2000; Iravani, Leung *et al.*, 2005). Seu mecanismo de

ação se dá pela sua ligação a receptores de membrana e ativação de vias de sinalização com subsequente ativação de genes pró-inflamatórios. O LPS se liga primeiramente no receptor intermediário CD14 formando um complexo LPS-CD14, que por sua vez, se liga ao receptor *Toll-like receptor-4* (TLR-4), que é uma proteína transmembrana. Essa associação, juntamente com uma proteína adaptadora acessória (MD2) inicia uma cascata de sinalização que envolve a ativação de proteínas quinases dependentes de mitógenos (MAPK) e fatores de transcrição como o fator nuclear kappa-B (NFκB). Essa cascata de sinalização culmina com a liberação de citocinas como TNF-α e IL-1β, ativação da enzima cicloxigenase 2 (COX-2) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), resultando na produção de ERO, liberação de prostaglandinas e óxido nítrico (NO) (Dutta, Zhang *et al.*, 2008).

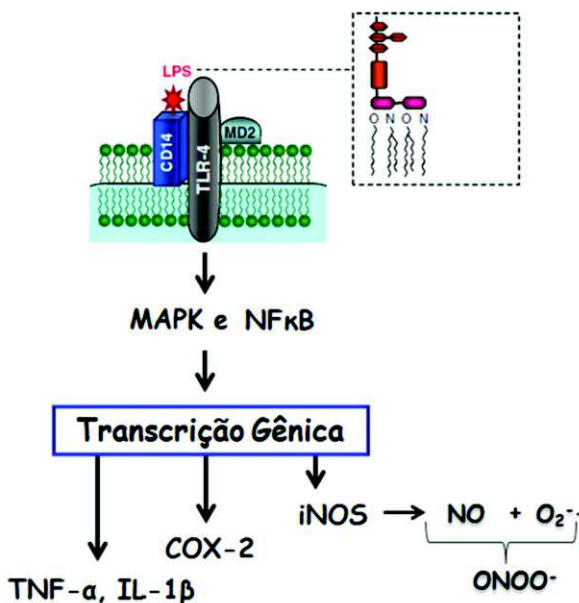


Figura 3: Mecanismo de toxicidade do LPS nos neurônios dopaminérgicos. O LPS se liga ao receptor intermediário CD14 formando um complexo LPS-CD14. LPS-CD14, por sua vez, se associa ao *Toll like receptor-4* (TLR-4) juntamente com a proteína adaptadora acessória MD2, desencadeando a ativação de vias de sinalização envolvendo a via das MAPK e NF-κB, culminando com transcrição de genes importantes na produção e liberação de citosinas como TNFα e IL-1β. A indução da expressão de COX-2 e iNOS resulta na biossíntese de prostaglandinas óxido nítrico (NO). O NO reage com o

radical ânion superóxido ($O^{\cdot -}$) produzido pela NADPH oxidase das células microgliais gerando peroxidonitrito ($ONOO^{\cdot -}$), causando estresse oxidativo e danos nos neurônios dopaminérgicos. LPS: lipopolissacarídeo; MAPK: proteínas cinases dependentes de mitógenos; COX-2: ciclooxigenase 2; iNOS: óxido nítrico sintase induzível. Adaptado de (Dutta, Zhang *et al.*, 2008).

O LPS induz ativação da micróglia em poucas horas após sua administração (Reinert, Umphlet *et al.*, 2014), seguido de liberação de fatores pró-inflamatórios e ERO que precede a neurodegeneração dopaminérgica (Herrera, Castano *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado que a injeção de LPS na substância negra resulta em progressiva e irreversível perda de neurônios dopaminérgicos nesta região (cerca 50-85%), bem como diminuição dos níveis de DA no estriado (Castano, Herrera *et al.*, 1998; Liu, Jiang *et al.*, 2000; Lu, Bing *et al.*, 2000). Assim como a administração diretamente na substância negra, a injeção sistêmica (intraperitoneal) de LPS causa ativação microglial nesta região e em outras áreas cerebrais, bem como progressiva neurodegeneração dopaminérgica (Perry, 2004). Após a administração de uma injeção intraperitoneal de LPS na dose de 5 mg/kg em camundongos C57Bl/6, foi observada uma redução dos neurônios dopaminérgicos de 23% e 43% após 7 e 10 meses da administração, respectivamente (Perry, 2004). Esses dados indicam que a administração de LPS a nível de SNC ou periférico é um bom modelo para estudar o papel da inflamação em relação a DP.

1.4 O CÉREBRO EM DESENVOLVIMENTO COMO UM ALVO DE TOXICIDADE: RELAÇÃO COM A DOENÇA DE PARKINSON

O SNC em desenvolvimento é muito mais vulnerável a agentes tóxicos do que o cérebro adulto. Essa vulnerabilidade está relacionada aos estágios de desenvolvimento cerebral tanto no período pré-natal (intrauterino) como pós-natal (primeira infância e infância). O cérebro humano, por exemplo, possui um período longo de desenvolvimento que se inicia na fase intrauterina e se prolonga por certo tempo posnatalmente. Processos como proliferação, migração neuronal, formação de conexões sinápticas, bem como a formação da barreira hematoencefálica continuam a ocorrer no período pós-natal tanto no cérebro humano como em roedores (Rodier, 1995; Rice e Barone, 2000). Além disso, o desenvolvimento de receptores e neurotransmissores, bem como a produção de mielina, também são processos que podem ocorrer no período pós-natal (Rodier, 1995; Rice e

Barone, 2000). Muitos dos agentes tóxicos interferem no processo de desenvolvimento culminando com o surgimento de doenças na fase adulta (Barouki, Gluckman *et al.*, 2012; Modgil, Lahiri *et al.*, 2014).

Em relação à DP, devido ao fato de ter sintomatologia evidenciada geralmente em estágios avançados da vida adulta, essa doença foi considerada uma condição relacionada ao envelhecimento ou à fatores ambientais da fase adulta. Entretanto, atualmente, existe uma razoável quantidade de estudos hipotetizando que fatores ambientais da vida perinatal (período intrauterino e/ou período pós-natal de desenvolvimento cerebral intenso), como a exposição à toxicantes ambientais como os pesticidas poderia predispor ou causar alguns sintomas da DP (Thiruchelvam, Richfield *et al.*, 2002; Barlow, Richfield *et al.*, 2004; Carvey, Punati *et al.*, 2006).

Além disso, evidências também sugerem que outro fator importante que poderia causar ou predispor danos ao sistema dopaminérgico nigroestriatal são as infecções virais ou bacterianas durante o desenvolvimento (Bilbo e Schwarz, 2012; Hagberg, Gressens *et al.*, 2012). É constatado hoje que infecções prenatais como a vaginose bacteriana em humanos, pode ser um potencial fator de risco para o desenvolvimento da DP (Tansey, McCoy *et al.*, 2007; Jang, Boltz *et al.*, 2009). Desta forma, a DP idiopática poderia representar uma consequência de distúrbios do desenvolvimento neural, ao invés de ser decorrente apenas do envelhecimento ou de insultos neurotóxicos exclusivos da fase adulta.

Neste cenário, um interessante fenômeno denominado *toxicidade silenciosa* parece ser de suma importância. Este fenômeno representa um insulto persistente de característica morfológica e/ou bioquímica que permanece “invisível” até que outro insulto a manifeste (Reuhl, 1991). Através de mecanismos compensatórios, o sistema afetado parece inicialmente normal quando analisado através de biomarcadores tradicionais de toxicidade (aspectos básicos de análises morfológicas e histológicas, testes comportamentais e estudos de mortalidade) (Heindel, 2006). Entretanto, é hipotetizado que a *toxicidade silenciosa* leva a um estado potencialmente alterado, em que uma homeostase anormal (associada a um maior risco de morte celular) é estabelecida de forma tempo- e tecido-dependente. Este conceito foi recentemente introduzido como um mecanismo para diversas doenças da vida adulta com uma possível origem no período de desenvolvimento (Godfrey e Barker, 2001; Costa, Aschner *et al.*, 2004; Barouki, Gluckman *et al.*, 2012).

Em relação à DP, evidências experimentais com roedores (Barlow, Richfield *et al.*, 2004) têm sugerido que exposições aos

pesticidas MB e PQ durante o período perinatal podem induzir uma condição de *toxicidade silenciosa* no sistema dopaminérgico. Esta condição parece contribuir para o aparecimento de sintomas similares aos observados na DP quando um evento posterior (novo insulto tóxico ou envelhecimento) ocorre e é capaz de “desmascarar” a *toxicidade silenciosa*. Thiruchelvam e colaboradores demonstraram que camundongos C57BL/6 previamente expostos a PQ + MB posnatalmente (dias PN 5-19) foram mais suscetíveis a uma posterior reexposição aos mesmos pesticidas na fase adulta (Thiruchelvam, Richfield *et al.*, 2002). Em outro estudo, camundongos expostos ao MB no período intrauterino e reexpostos ao PQ na vida adulta apresentaram diminuição de neurônios TH⁺ na SNpc, o que não foi observado nos animais tratados apenas prenatalmente ou na fase adulta (Barlow, Richfield *et al.*, 2004). Em outro estudo, camundongos C57BL/6 expostos prenatalmente ao MB (dia gestacional 10-17) foram mais suscetíveis à exposição ao PQ na vida adulta. A exposição pré-natal ao MB, seguido de uma reexposição ao PQ na vida adulta causou diminuição na atividade locomotora, redução nos níveis de dopamina e nos neurônios TH⁺ na SNpc (Barlow, Richfield *et al.*, 2004). Ambos os modelos de exposição a pesticidas durante o desenvolvimento (período pré-natal ou pós-natal) parecem aumentar a vulnerabilidade a subsequentes exposições a estes toxicantes na vida adulta. Esses insultos durante o desenvolvimento indicam uma possível *toxicidade silenciosa*, na qual os efeitos das exposições perinatais aos pesticidas apenas são revelados na fase adulta mediante uma segunda exposição aos mesmos ou à difentes toxicantes. Entretanto, os mecanismos envolvidos nesta condição de *toxicidade silenciosa* ainda não foram elucidados.

Além da exposição a pesticidas, outro fator importante durante o desenvolvimento é o processo inflamatório. Estudos recentes com roedores mostram que uma perturbação no balanço fino entre a ativação do sistema imunológico e o desenvolvimento cerebral pode causar uma predisposição a doenças neurológicas na vida adulta tardia (Bilbo e Schwarz, 2009; 2012; Bolton e Bilbo, 2014). O sistema imune, tanto no SNC quanto na periferia, é crucial para o desenvolvimento normal do cérebro, onde qualquer alteração pode ter impactos adversos sobre o sistema nervoso. Por exemplo, a sinalização do sistema imune via micróglia, durante o desenvolvimento, é crítica na manutenção da homeostase, neurogênese, plasticidade sináptica e formação dos circuitos cerebrais (Garay e Mcallister, 2010; Bilbo e Schwarz, 2012). Quando o cérebro imaturo é exposto à inflamação, que pode ser via uma infecção viral ou bacterina, processos inflamatórios e reparativos são

ativados. Esses processos podem combater a infecção ou então podem contribuir para danos no SNC, ou ainda aumentar sua vulnerabilidade a insultos posteriores (Bilbo e Schwarz, 2012; Hagberg, Gressens *et al.*, 2012).

Notavelmente, estudos mostram que a ativação do sistema imunológico de roedores durante o desenvolvimento por meio da exposição a agentes tóxicos, pode ter consequências tardias sobre função do sistema imune e no comportamento dos animais na vida adulta (Bilbo e Schwarz, 2009; 2012). Por exemplo, um estudo baseado no efeito direto do LPS como um indutor de toxicidade nos neurônios dopaminérgicos, mostrou que a administração de LPS (1 mg/kg) a ratas prenhas no dia gestacional 10,5 causou uma diminuição nos neurônios dopaminérgicos na *SNpc* e na área tegmentar ventral (VTA) dos filhotes com 3 semanas de idade (Ling, Gayle *et al.*, 2002). Num estudo seguinte, este mesmo grupo de pesquisa mostrou que o sistema dopaminérgico previamente danificado pela exposição pré-natal ao LPS foi mais vulnerável à toxicidade induzida pela rotenona na vida adulta (Ling, Chang *et al.*, 2004).

Além disso, Fan e colaboradores mostraram que a administração intracerebroventricular de LPS no dia PN 5 resulta em déficit motor e perda significativa de peso corporal; tais alterações voltam aos níveis do controle nos animais adultos (PN 70). Porém, nesses animais adultos, que não apresentaram alterações comportamentais, foi observada diminuição de neurônios TH⁺ na *SNpc*, bem como ativação microglial (Fan, Tien, Zheng *et al.*, 2011). Em outros estudos, foi demonstrado que a exposição pós-natal de ratos ao LPS (dia PN 5, injeção sistêmica ou central) aumenta a vulnerabilidade do sistema dopaminérgico à toxicidade da rotenona na vida adulta, como indicado por alterações em testes comportamentais e diminuição de neurônios TH⁺ (Fan, Tien, Lin *et al.*, 2011; Fan, Tien, Zheng *et al.*, 2011; Tien, Kaizaki *et al.*, 2013). Esses estudos têm hipotetizado que um estado de *toxicidade silenciosa* pode ser responsável por aumentar a susceptibilidade a insultos tóxicos na vida adulta, porém os mecanismos responsáveis pela *toxicidade silenciosa* não são conhecidos até o presente momento.

2. JUSTIFICATIVA

Conforme mencionado anteriormente, estudos apontam para a exposição a pesticidas (principalmente MB e PQ) e para eventos inflamatórios como potenciais causadores de uma *toxicidade silenciosa* no sistema dopaminérgico, a qual representa um fator que parece contribuir para a etiologia da DP idiopática. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares relacionados a este fenômeno. De fato, não se sabe quais são as alterações bioquímicas e/ou morfológicas decorrentes da exposição perinatal a pesticidas ou LPS que podem induzir à neurotoxicidade dopaminérgica tardia. Além disso, não se sabe quais são as respostas compensatórias do SNC após a exposição a tais compostos e se estes eventos podem ser responsáveis por uma neurotoxicidade cumulativa.

As evidências acima-mencionadas, baseadas tanto em dados experimentais quanto epidemiológicos, explicitam a necessidade de se estudar melhor os mecanismos relacionados aos efeitos de pesticidas e da inflamação sobre o sistema dopaminérgico em desenvolvimento. Neste contexto, o proposto projeto visa contribuir para o entendimento de mecanismos moleculares relacionados aos efeitos da exposição perinatal a neurotóxicos ambientais (como PQ e MB) e do processo inflamatório no desenvolvimento da doença de Parkinson. Este entendimento parece ser de suma importância tendo em vista a significativa exposição aos pesticidas durante as fases iniciais da vida, bem como devido ao papel da inflamação como um fator de risco para o desenvolvimento de neuropatologias. Assim, a hipótese do presente trabalho é que a exposição de camundongos durante o período pós-natal ao PQ + MB ou ao LPS causa alterações bioquímicas no estriado e na substância negra, aumentando a suscetibilidade dos animais a uma segunda exposição na fase adulta.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista os aspectos mencionados anteriormente, este trabalho tem como objetivo (i) investigar os mecanismos relacionados à neurotoxicidade dopaminérgica tardia decorrente da exposição aos pesticidas paraquat e maneb no sistema nigroestriatal em desenvolvimento, relacionando-os com o eventual aumento da suscetibilidade a insultos neurotóxicos decorrentes da exposição aos mesmos toxicantes durante a fase adulta; (ii) investigar os mecanismos relacionados à neurotoxicidade dopaminérgica tardia decorrente da exposição ao LPS no sistema nigroestriatal em desenvolvimento, relacionando-os com o eventual aumento da suscetibilidade a insultos neurotóxicos decorrentes da exposição a pesticidas na fase adulta; (iii) investigar o efeito da exposição aos pesticidas paraquat e maneb em cultivos de células tronco neurais sob parâmetros de proliferação e diferenciação celular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar o efeito da exposição pós-natal de camundongos aos pesticidas PQ e MB sobre parâmetros comportamentais relacionados ao sistema motor e parâmetros bioquímicos tais como (i) marcadores de neurônios dopaminérgicos (TH e DAT) no estriado e na SNpc, (ii) marcadores de inflamação (níveis de TNF- α e interleucina-6), (iii) atividade dos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial no estriado, (iv) atividade de enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido dismutase e catalase), bem como marcadores de estresse oxidativo como níveis de peroxidação lipídica e tióis não-proteicos no estriado;

2. Investigar, em camundongos expostos posnatalmente aos pesticidas paraquat e maneb, o efeito de uma segunda exposição aos mesmos pesticidas (durante a vida adulta - 3 meses de idade) sobre parâmetros comportamentais relacionados ao sistema motor e parâmetros bioquímicos tais como (i) marcadores de neurônios dopaminérgicos (TH e DAT) no estriado e na SNpc, (ii) níveis de dopamina e seus metabólitos no estriado, (iii) atividade dos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons no estriado;

3. Investigar o efeito da exposição pós-natal de camundongos ao LPS sobre parâmetros comportamentais relacionados ao sistema motor e parâmetros bioquímicos tais como (i) marcadores de neurônios dopaminérgicos (TH e DAT) no estriado e na *SNpc*, (ii) marcadores de inflamação (níveis de TNF- α e IL-6), (iii) atividade dos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons no estriado, (iv) atividade de enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, glutathione redutase, superóxido dismutase e catalase), bem como marcadores de estresse oxidativo como níveis de peroxidação lipídica e tióis não-proteicos no estriado;

4. Investigar, em camundongos previamente expostos ao LPS posnatalmente, o efeito da exposição aos pesticidas PQ e MB (durante a vida adulta - 3 meses de idade) sobre parâmetros comportamentais relacionados ao sistema motor e parâmetros bioquímicos tais como (i) marcadores de neurônios dopaminérgicos (TH e DAT) no estriado e na *SNpc*, (ii) níveis de dopamina e seus metabólitos no estriado, (iii) atividade dos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons no estriado;

5. Avaliar o efeito da exposição aos pesticidas PQ e MB em cultivos primários de células tronco neurais de rato sobre parâmetros de proliferação celular tais como (i) imunomarcção para KI-67 e nestina, (ii) expressão gênica de proteínas envolvidas no ciclo celular; (iii) parâmentors de estresse oxidativo, (iv) determinação de marcadores de diferenciação celular.

4. METODOLOGIAS

4.1 ESTUDO *IN VIVO*

4.1.1 Animais

Camundongos *Swiss* fêmeas foram obtidos do Biotério Central da UFSC, no vigésimo dia gestacional (DG 20). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada de 22 +/- 2 °C e ciclo claro/escuro 12:12 horas (7:00 - 19:00 horas). Após o nascimento dos filhotes, no dia pós-natal 3 (PN 3), as ninhadas foram padronizadas em machos e fêmeas com no máximo 10 filhotes por ninhada. Os filhotes foram utilizados para os tratamentos entre o dia PN 5 ao dia PN 19. No dia PN 22 foi realizado o desmame e os animais mantidos até as análises comportamentais e bioquímicas.

Foram utilizadas um total de 52 ninhadas para desenvolver o estudo descrito nesta tese, dentre estas, quatro ninhadas foram excluídas das análises em função a problemas de saúde apresentados pela genitora. Os protocolos experimentais foram realizados em três etapas distintas devido ao grande número de animais utilizados e às diferentes análises realizadas. O número total de animais utilizados para desenvolver todo o estudo (protocolo experimental PN e adulto) foi de 454 animais, sendo que 26 camundongos (14 machos e 12 fêmeas) do grupo LPS morreram após a exposição PN ao LPS. Dos 428 animais restantes, 178 foram avaliados após a primeira exposição (dia PN 30). Os demais camundongos (n= 250) foram mantidos até a vida adulta para o protocolo de segunda exposição. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo de números PP00765. Os pesticidas paraquat e maneb foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich.

4.1.2 Protocolos Experimentais

4.1.2.1 Desenho Experimental I

Camundongos *Swiss* machos e fêmeas (n=2-3 animais/ninhada) foram expostos concomitantemente aos pesticidas PQ (0,3 mg/kg) e ao MB (1 mg/kg) durante o período compreendido entre os dias pós-natais 5 ao 19, através de injeções diárias subcutâneas (s.c.). Os animais controles receberam apenas veículo (solução salina). As doses dos

pesticidas foram baseadas na literatura (Thiruchelvam, Richfield *et al.*, 2002; Cory-Slechta, Thiruchelvam *et al.*, 2005) e representam 1/30 das doses utilizados em animais adultos. O desenho experimental está esquematizado na figura 4.

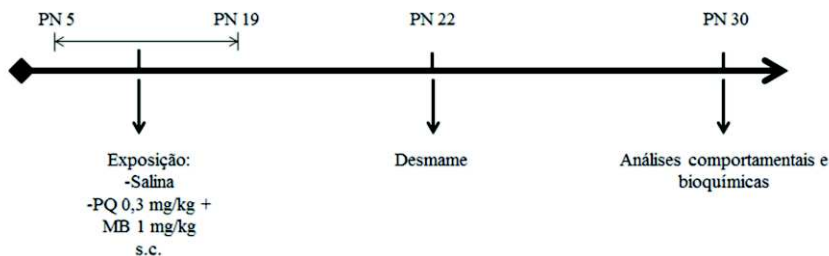


Figura 4: Linha do tempo descritiva para a exposição pós-natal ao PQ + MB. Camundongos machos e fêmeas foram expostos aos pesticidas PQ (0,3 mg/kg) e ao MB (1 mg/kg) entre os dias pós-natais 5 ao 19, através de injeções diárias subcutâneas (s.c.). Os animais controle receberam apenas salina. O desmame foi realizado no dia PN 22 e as análises comportamentais e bioquímicas no dia PN 30.

O peso dos animais foi monitorado diariamente para ajuste das doses e nenhuma mortalidade foi observada durante as exposições ao PQ + MB. Após a exposição pós-natal aos pesticidas, foi realizado o desmame no dia PN 22 e os animais foram mantidos até as análises comportamentais e bioquímicas no dia PN 30. O n experimental para as análises comportamentais representa o número de ninhadas (média de dois ou três animais por ninhada), e para as análises bioquímicas representa animais individuais. O n experimental de cada análise está descrito nas legendas das figuras e tabelas.

4.1.2.2 Desenho Experimental II

Camundongos Swiss previamente expostos ao PQ + MB (40 machos e 37 fêmeas) ou ao veículo (44 machos e 41 fêmeas) durante o período PN de desenvolvimento (segundo protocolo experimental 1), foram divididos em mais 2 grupos, totalizando 4 grupos experimentais para a segunda exposição como segue abaixo:

-Grupo 1: Salina + salina (camundongos tratados com salina posnatalmente e reexpostos à salina na vida adulta; n= 22 machos e 20 fêmeas);

-Grupo 2: (PQ + MB) + Salina (camundongos tratados com PQ + MB posnatalmente e expostos a salina na vida adulta; n= 20 machos e 18 fêmeas);

-Grupo 3: Salina + (PQ + MB) (camundongos tratados com salina posnatalmente e expostos ao PQ + MB na vida adulta; n= 22 machos e 21 fêmeas);

-Grupo 4: (PQ + MB) + (PQ + MB) (camundongos tratados com PQ + MB posnatalmente e reexpostos aos pesticidas na vida adulta; n= 20 machos e 19 fêmeas).

Aos 3 meses de idade, os camundongos foram reexpostos ao PQ (10 mg/kg) e ao MB (30 mg/kg) ou à salina duas vezes por semana durante 6 semanas através de administrações subcutâneas. As doses utilizadas na segunda exposição também foram baseadas na literatura (Cory-Slechta et al. 2005; Thiruchelvam et al. 2002) e em estudo piloto no nosso laboratório. O desenho experimental está esquematizado na figura 5. Durante o protocolo de reexposição, quatro camundongos machos e três fêmeas do grupo 3 - Salina + (PQ+MB) - e oito camundongos machos e cinco fêmeas do grupo 4 - (PQ+MB) + (PQ+MB) - morreram, respectivamente (uma curva de sobrevivência está representada na seção dos resultados).

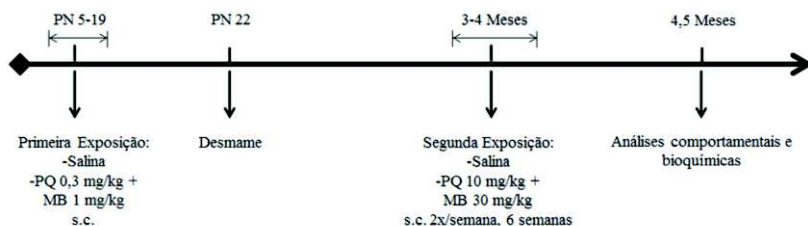


Figura 5: Linha do tempo descritiva para a reexposição ao PQ + MB na fase adulta. Camundongos machos e fêmeas foram expostos aos pesticidas PQ (0,3 mg/kg) e MB (1 mg/kg) entre os dias pós-natais 5 a 19, através de injeções diárias subcutâneas (s.c.). Os animais controle receberam apenas salina. O desmame foi realizado no dia PN 22. Aos 3 meses, foi realizada a reexposição aos pesticidas (PQ 10 mg/kg + MB 30 mg/kg) ou a salina pela via s.c., 2x/semana durante 6 semanas. As análises comportamentais e bioquímicas foram efetuadas 1 semana após a última administração.

4.1.2.3 Desenho Experimental III

Para o estudo do efeito da exposição ao LPS, camundongos Swiss machos e fêmeas (n=3-4 animais/ninhada) foram expostos ao LPS (1 mg/kg) pela via intraperitoneal (i.p.) em duas administrações distintas, uma no dia PN 5 e outra no PN 10 (Fan et al. 2011b). Os animais controles receberam solução salina. O ganho de peso dos animais foi monitorado diariamente. Após a exposição pós-natal ao LPS, foi realizado o desmame no dia PN 22 e os animais foram mantidos até as análises comportamentais no dia PN 30. O desenho experimental está esquematizado na figura 6. O n experimental para as análises comportamentais representa o número de ninhadas (média de três animais por ninhada), e para as análises bioquímicas representa animais individuais. O n experimental em cada análise está descrito nas legendas das figuras e tabelas.

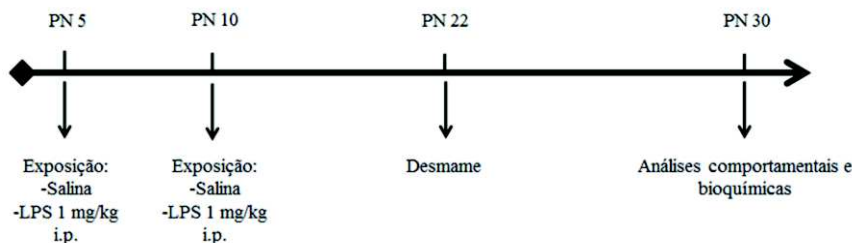


Figura 6: Linha do tempo descritiva para a exposição pós-natal ao LPS. Camundongos machos e fêmeas foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias pós-natais 5 e 10. Os animais controle receberam apenas salina. O desmame foi realizado no dia PN 22 e as análises comportamentais e bioquímicas no dia PN 30.

4.1.2.4 Desenho Experimental IV

Camundongos Swiss expostos ao LPS (43 machos e 45 fêmeas) ou ao veículo (44 machos e 41 fêmeas) durante o desenvolvimento foram redivididos em mais 2 grupos, totalizando 4 grupos experimentais para a segunda exposição como segue abaixo:

-Grupo 1: Salina + salina (camundongos tratados com salina posnatalmente e reexpostos à salina na vida adulta; n= 22 machos e 20 fêmeas);

-Grupo 2: LPS + salina (camundongos tratados com LPS posnatalmente e expostos à salina na vida adulta; n= 21 machos e 22 fêmeas);

-Grupo 3: Salina + (PQ + MB) (camundongos tratados com salina posnatalmente e expostos ao PQ + MB na vida adulta; n= 22 machos e 21 fêmeas);

-Grupo 4: LPS + (PQ + MB) (camundongos tratados com LPS posnatalmente e expostos aos pesticidas na vida adulta; n= 22 machos e 23 fêmeas).

Aos 3 meses de idade, os camundongos foram expostos ao PQ (10 mg/kg) e ao MB (30 mg/kg) ou a salina duas vezes por semana durante 6 semanas através de administrações subcutâneas. O desenho experimental está esquematizado na figura 7. Durante a exposição aos pesticidas, quatro camundongos machos e quatro fêmeas do grupo expostos ao LPS no período PN seguida da exposição ao PQ+MB na vida adulta morreram (uma curva de sobrevivência está representada na seção dos resultados).

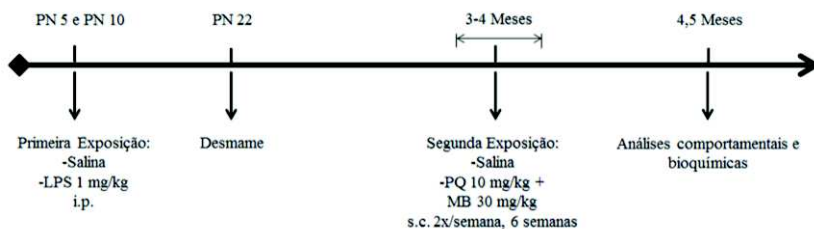


Figura 7: Linha do tempo descritiva para a exposição ao PQ + MB na fase adulta em camundongos previamente expostos ao LPS no período PN. Camundongos machos e fêmeas foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias PN 5 e 10. Os animais controle receberam apenas salina. O desmame foi realizado no dia PN 22. Aos 3 meses, foi realizada a exposição aos pesticidas (PQ 10 mg/kg + MB 30 mg/kg) ou a salina pela via s.c., 2x/ semana durante 6 semanas. As análises comportamentais e bioquímicas foram efetuadas 1 semana após a última administração.

4.1.3 Análises Comportamentais

4.1.3.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para investigar a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais (Figura 8A).

Os camundongos foram colocados individualmente no centro de um campo aberto de plástico circular azul (diâmetro = 44 cm, altura = 22 cm), com setores desenhados no chão. O número de cruzamentos (número de quadrados cruzados pelo animal com as quatro patas) foi utilizado para avaliar a atividade locomotora, e o número de levantadas (número de vezes que os animais se equilibram sobre as patas traseiras ou atividade exploratória vertical) para avaliar o comportamento exploratório. Os parâmetros foram registrados em um período de 6 min (Santos, Peres *et al.*, 2012). O aparato foi higienizado com uma solução de etanol 10% entre os testes de cada animal, a fim de remover os odores ou pistas.

4.1.3.2 Teste do *rotarod*

O teste do *rotarod* foi utilizado para avaliar a integridade e coordenação motora dos animais. O aparato consistiu de uma barra giratória de 30 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro subdividida em 4 compartimentos (Figura 8B). Para as análises no dia PN 30 foi realizado o protocolo de aceleração (Khariv, Pang *et al.*, 2013), onde os animais eram colocados sobre a barra numa velocidade inicial de 5 rpm, a qual foi aumentando em média 1,25 rpm a cada 30 segundos durante 6 minutos, atingido uma velocidade final de 20 rpm. O tempo de latência para a primeira queda dos camundongos foi anotado.

Nos animais adultos foi realizado o protocolo com velocidade constante de 21 rpm durante 240 segundos (Colle, Santos *et al.*, 2013). Antes do início da segunda exposição, os animais foram treinados, onde eles tiveram 10 tentativas para conseguir andar no *rotarod* por 1 minuto sem cair. Após a segunda exposição, os animais foram colocados para andar no *rotarod* e o tempo de latência para a primeira queda e o número de quedas foram utilizados para as análises estatísticas.

4.1.3.3 Teste do *beam walking*

O *beam walking* consistiu de uma viga de plástico de 100 cm de comprimento e 12 ou 6 mm de largura, posicionada a 50 cm do chão. Uma caixa contendo serragem foi colocada no final da viga para que os animais tivessem um incentivo para atravessar e chegar num local seguro (Figura 8C). Antes dos animais serem colocados na viga, eles eram deixados por 2 minutos nesta caixa para ambientação. Para as avaliações no PN 30, os camundongos foram habituados ao aparato (12 mm) 1 dia antes da realização do teste através de 5 provas, nas quais era

ensinado aos animais a tarefa de atravessar a viga sem parar até a caixa com serragem. Um intervalo de 2 minutos foi realizado entre cada prova para permitir o descanso dos animais. Para os animais adultos os treinos ocorreram antes da segunda exposição aos pesticidas na vida adulta, utilizando uma viga de 12 mm de largura. No dia do teste, os camundongos foram colocados na viga de 6 (camundongos jovens, PN30) ou 12 mm (camundongos adultos) de diâmetro inclinada levemente (15 graus) e o tempo para atravessar a viga, bem como o número de revaladas com as patas traseiras foram utilizados como medidas (Khariv, Pang *et al.*, 2013). A média de três provas foi utilizada para análise estatística.

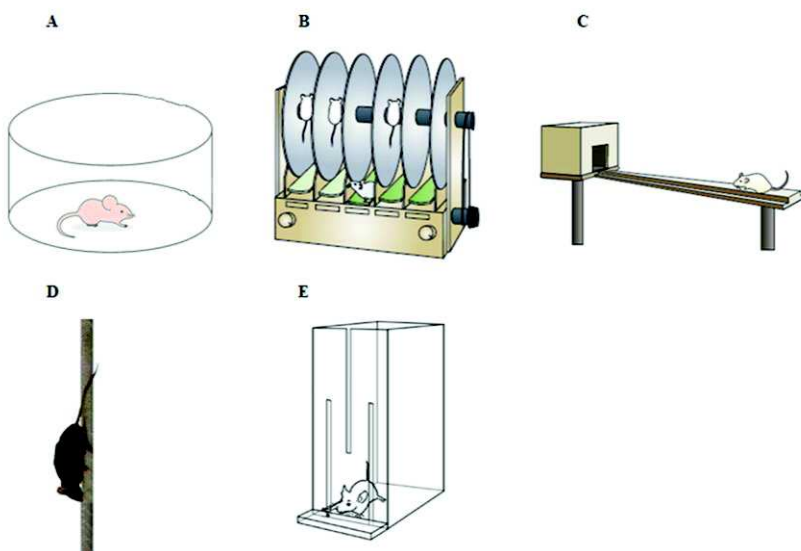


Figura 8: Desenho esquemático dos testes comportamentais. A) Campo aberto, B) *rotarod*, C) *beam walking*, D) *pole test* e D) *single pellet*. Fonte: (Brooks e Dunnett, 2009; Chen, Gilmore *et al.*, 2014).

4.1.3.4 *Pole test*

O *pole test* é utilizado para medir a bradicinesia em modelos animais de DP (Park, Park *et al.*, 2013; Aras, Tanriover *et al.*, 2014). Para o teste foi utilizado um poste de ferro (50 cm de comprimento e 0,8 cm de diâmetro) revestido com esparadrapo para se obter uma superfície áspera, e fixado numa caixa contendo serragem para proteção contra eventuais quedas. Após o desmame, os animais foram previamente habituados onde foram colocados no topo do poste com a cabeça voltada para baixo e foi permitida a descida para a base do poste. Cada teste teve um tempo máximo de 60 segundos para o animal realizar a descida. Os animais que não aprendiam eram guiados até a base do poste. Foram realizadas 3 provas de habituação antes do teste. No dia do teste, os animais foram colocados no topo do poste com a cabeça voltada para cima e o tempo para virar a cabeça para baixo (início do movimento) e o tempo de latência para descer do poste até a base foram anotados. Foram realizadas 3 provas e a média dos tempos de cada prova foi utilizada como resultado (Aras, Tanriover *et al.*, 2014). Na figura 8D, apresentada anteriormente, está representado um desenho esquemático do teste.

4.1.3.5 Teste do *single pellet*

Este teste consiste em uma tarefa de execução para avaliação da coordenação motora - começa com a olfação da pastilha de ração na parte frontal da câmara, seguido pelo movimento de levantamento da pata anterior, e ajuste postural para projetar a pata através de uma fenda estreita em direção à pastilha de comida até alcançar o alvo. Antes da realização do teste, os animais passaram por quatro dias prévios de treinamento e, para isto, eles foram submetidos a jejum de aproximadamente 20 horas antes de cada treino.

O teste foi realizado numa caixa de acrílico transparente medindo 19,5 cm de comprimento, 8 cm de largura e 20 cm de altura, com uma fenda vertical de 1 cm de largura e 15 cm de altura. Um suporte de 0,2 cm de espessura, 8 cm de comprimento e 2 cm de largura, situado a 1,1 cm do chão, na frente da câmara foi o local utilizado para apresentar uma pastilha de ração (o pellet) ao camundongo. Uma representação esquemática do aparato utilizado no teste está mostrada na figura 8E.

Para a realização do treinamento, as pastilhas de ração com cerca de 20 mg foram posicionadas no suporte, distante 1 cm da fenda e de forma central às extremidades. Os animais foram colocados na caixa com a cabeça voltada para o local onde era colocada a pastilha de ração devendo ele aprender a pegá-la com a pata dianteira. Os animais foram treinados individualmente durante 10 minutos. Durante o treino, cada animal deveria pegar dez pastilhas de ração, de modo que se o animal conseguisse agarrar a ração através da fenda, sem deixar que a mesma caísse no chão, a tentativa era considerada como sucesso (“S”). No entanto, se o animal batesse na pastilha de ração sem pegá-la ou a deixasse cair após pegá-la, a tentativa era considerada como fracasso (“F”). Todos os treinos foram realizados nos animais adultos antes de iniciar o protocolo da segunda exposição. Os animais que não aprenderam a tarefa foram descartados do teste final (3 animais machos e 1 fêmea do grupo salina + salina; 4 machos e 2 fêmeas do grupo salina + (PQ+MB); 1 macho do grupo (PQ+MB) + salina; 1 macho e 1 fêmea do grupo (PQ+MB) + (PQ+MB); 6 machos e 1 fêmea do grupo LPS + salina; 2 fêmeas do grupo LPS + (PQ+MB)). No dia do teste foi anotado o número de sucessos e fracassos para apanhar a pastilha de ração num total de 10 tentativas no tempo máximo de 10 minutos. Os dados foram representados como porcentagem de sucessos: $\% \text{ Sucessos} = S/(S+F) \times 100$. Este teste foi realizado somente nos animais adultos como descrito previamente (Chen, Gilmore *et al.*, 2014; Schmitz, De Oliveira *et al.*, 2014).

4.1.4 Análises Bioquímicas

4.1.4.1 Preparação tecidual para as análises bioquímicas

Após as análises comportamentais, os animais foram mortos por decapitação e os estriados foram removidos e homogeneizados em 10 volumes de tampão HEPES 20 mM, pH 7,0 e centrifugados a 5.000 x g a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante gerado foi utilizado para determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e níveis de tióis não proteicos (NPSH). Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), os estriados foram homogeneizados em 10 volumes de tampão HEPES 20 mM, pH 7,0 e centrifugados a 16.000 x g a 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante gerado foi utilizado para determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

Para determinação da atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, os estriados foram homogeneizados em 10 volumes de tampão fosfato (pH 7,4), contendo 0,3 M de sacarose, 5 mM de MOPS, 1 mM de EGTA e 0,1% de albumina. Os homogenatos teciduais foram centrifugados a 1000 x g a 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade NADH desidrogenase (complexo I) e do complexo II.

4.1.4.2 Peroxidação lipídica

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas em homogenatos do estriado utilizando o método descrito por Ohkawa e colaboradores (Ohkawa, Ohishi *et al.*, 1979), no qual o malondialdeído (MDA), um produto final de peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico para formar um complexo colorido. As amostras foram incubadas a 100 °C durante 60 minutos em meio ácido, contendo 0,45% de SDS e 0,67% de ácido tiobarbitúrico. Após centrifugação, foi determinado o produto da reação espectrofotometricamente a 532 nm utilizando MDA como padrão. Os dados foram expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

4.1.4.3 Níveis de tióis não-proteicos (NPSH)

O conteúdo de tióis não-protéicos (NPSH) foi mensurado através do método descrito por Ellman (Ellman, 1959), que determina principalmente glutathiona reduzida (GSH). As amostras foram precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) 10% gelado e centrifugadas a 5.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi incubado com DTNB em tampão fosfato 1 M pH 7,0. As absorbâncias foram mensuradas em 412 nm e uma curva de glutathiona reduzida foi utilizada para calcular os níveis de NPSH. Os dados foram expressos como nmol de NPSH/mg de proteína.

4.1.4.4 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi determinada através do método de Wendel, utilizando peróxido de *terc*-butila como substrato (Wendel, 1981). A GPx catalisa a redução de H₂O₂, bem como outros peróxidos orgânicos, utilizando a GSH como co-substrato e produzindo glutathiona oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida pela

glutathiona redutase com o consumo de NADPH, que foi mensurado através da leitura em espectrofotômetro em 340 nm. A atividade da GPx foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína. A atividade da glutathiona redutase (GR) foi determinada através do método descrito por Carlberg e Mannervik (Carlberg e Mannervik, 1985). A taxa de redução da GSSG foi determinada indiretamente através do monitoramento do consumo (oxidação) do NADPH a 340 nm. A atividade da GR foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

A atividade da catalase foi medida pelo método de Aebi (Aebi, Wyss *et al.*, 1974). A reação foi iniciada pela adição de 300 mM de H_2O_2 e a taxa de consumo do H_2O_2 foi medida espectrofotometricamente a 240 nm. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada segundo Misra e Fridovich (Misra e Fridovich, 1972). Adicionando-se o homogenato que contém a enzima inibe a auto-oxidação da epinefrina que é monitorada espectrofotometricamente a 480 nm. Por definição, uma unidade da atividade enzimática é a quantidade de enzima capaz de produzir 50% de inibição da auto-oxidação da epinefrina. A atividade enzimática da SOD é expressa como unidade (U)/mg de proteína.

4.1.4.5 Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial

A atividade do complexo I (NADH desidrogenase) foi medida através da taxa de redução do ferricianeto a 420 nm, dependente de NADH, como descrito por Cassina e Radi (Cassina e Radi, 1996). A atividade da succinato-2,6-dicloroindofenol (DCIP)-oxidoreductase (complexo II) foi determinada segundo Fischer e colaboradores (Fischer, Ruitenbeek *et al.*, 1985). Os métodos descritos foram ligeiramente modificados por Latini e colaboradores (Latini, Da Silva *et al.*, 2005). As atividades dos complexos da cadeia respiratória foram calculadas como nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

4.1.4.6 Determinação de citocinas inflamatórias

Para determinação das citocinas inflamatórias, os estriados foram homogeneizados em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 contendo 20 % de Tween-20, 0,1 mM de PMSF, 10 mM de EDTA, 0,5% de albumina de soro bovino, 0,4 M de NaCl e inibidores de proteases. As amostras foram centrifugadas a 3000 g x a 4 °C durante 10 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram congelados a -70°C até as análises serem

efetuadas. Para a determinação estriatal das citocinas foi utilizado o kit *CBA Enhanced Sensitivity Flex Set System* para camundongos e foram mensurados os níveis de IL-6 e TNF- α simultaneamente através de citometria de fluxo (FACS Canto II, BD Biosciences, NJ, EUA), conforme instruções do fabricante (CBA; BD Biosciences, San Jose, CA).

4.1.4.7 Determinação dos níveis de dopamina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras de estriado foram homogeneizadas na proporção 1:5 em uma solução de ácido perclórico a 0,2 M contendo 100 μ M de EDTA. Em seguida incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz para o processo de desproteínização, e então centrifugadas a 10 000 x g por 15 minutos a 4 °C. O pH do sobrenadante foi ajustado para 3,35 com ácido acético 1 M. As amostras foram armazenadas a -70°C até as análises.

Alíquotas de 10 μ l das amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000), equipado com uma coluna C18 de fase reversa (Supelco LC-18, 150mm x 4,6mm, 5 μ m Ø interno) termostatizada a 40°C e detector espectrofotométrico UV-visível (λ = 280nm). As amostras foram eluídas utilizando sistema isocrático da solução água destilada: metanol: ácido fosfórico (97, 5:2:0,1; v/v/v) como fase móvel e fluxo de 0,5 mL/min. Para a construção da curva padrão externa utilizou-se a dopamina (Sigma H8502 - CAS 62-31-7: 1 μ g/mL – 10 μ g/mL, $y = 301.x$, $r^2 = 0,99$). Os resultados obtidos foram expressos como equivalentes de dopamina.

4.1.4.8 Dosagem de proteínas

O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Lowry (Lowry, Rosebrough *et al.*, 1951), usando albumina de soro bovino para curva padrão.

4.1.5 Análises imunoistoquímicas

Para as análises imunoistoquímicas no estriado e SNpc os camundongos foram anestesiados com hidrato de cloral 40% e logo perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com solução salina (NaCl 0,9%), seguida por uma solução fixadora de paraformaldeído 4%

em 0,1 M de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4. Após a perfusão, os cérebros foram removidos e pós-fixados na mesma solução fixadora durante 24 h à temperatura ambiente. Para as avaliações no dia PN 30, os cérebros foram crioprotetidos por imersão em solução de sacarose 30% em PBS a 4°C. Após, os cérebros foram congelados por imersão em isopentano resfriado e armazenados em congelador (-70°C). Cortes coronais em série (20 µM) de estriado e substância negra foram obtidos com um criostato (Modelo Leica) a -21°C. Para as avaliações após a segunda exposição aos pesticidas (protocolo experimental 2 e 4), os cérebros foram mantidos em solução de sacarose a 30 % em PBS a 4 °C e os cortes foram obtidos a partir de um vibrátomo (Vibratome Series 1000, Sectioning System).

Para realização das análises, primeiramente os cortes foram incubados com 0,3 % de H₂O₂ em PBS contendo 0,15 % de triton X-100 (PBS-T) por 30 minutos para inibição das peroxidases endógenas. Após, foi realizado o bloqueio de marcações inespecíficas em 5% de soro de cabra ou coelho em PBS-T por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram incubadas *overnight* a 4 °C com os seguintes anticorpos primários: TH (1:500; US Biological, MA, USA), DAT (1:8000; Millipore, MA, USA), GFAP (1:500; Dako, DEN) e Iba-1 (1:1000; Millipore, MA, USA). Após três lavagens em PBS-T, as secções de tecido foram incubadas durante 1 hora com os seguintes anticorpos secundários biotinizados: anti-coelho (1:250, Vector Laboratories, CA, USA), anti-rato (1:250, Vector Laboratories, CA, USA) ou anti-camundongo (1:250, Sigma, MO, USA). Em seguida, as amostras foram incubadas durante 1 hora com o complexo avidina-biotina (1:125, Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, CA, USA), seguido da reação de revelação com 0,035 % de cloreto de 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma, MO, USA). As secções foram montadas em lâminas tratadas com gelatina e cobertas com lamínulas utilizando o meio de montagem Entellan (Merck, GER) para posterior observação microscópica.

As lâminas foram quantificadas a cegas utilizando números consecutivos como identificação. A contagem dos neurônios TH e DAT positivos na SN_{pc}, bem como a densidade óptica (DO) para TH e DAT no estriado foram quantificados utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

4.2 ESTUDOS *IN VITRO*

4.2.1 Animais

Os estudos *in vitro* foram realizados no Departamento de Neurociências do Instituto Karolinska, Estocolmo, Suécia. Para os estudos *in vitro*, foram utilizados ratos Sprague Dawley prenhas no dia gestacional (DG) 15 (n= 20). Os animais foram obtidos do laboratório Charles River (Charles River, Alemanha) no DG 13 e mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada de 20,5 – 22,5 °C e ciclo claro/escuro 12:12 horas (6:00 - 18:00 horas) e umidade relativa de 60 %. Todos os procedimentos foram realizados em acordo com a regulação Européia de uso de animais e aprovados pelo comitê de ética de Estocolmo (Ethical Committee Stockholm North - ethical permit number N190/14r).

4.2.2 Preparação dos cultivos primários de células tronco neurais

Os cultivos primários de células tronco neurais (do inglês *neural stem cells*, NSC) foram preparados a partir de córtices de embriões no dia DG 15 (Tamm, Duckworth *et al.*, 2006; Tofighi, Moors *et al.*, 2011). Os córtices foram dissecados em solução tampão Hank's (HBSS), mecanicamente processados e em seguida ressuspensos em meio N2 (DMEN F12 - GIBCO, suplementado com 25 µg/mL de insulina, 20 nM de progesterona, 0,1 mM de putrecina, 30 nM de selenito de sódio e 0,1 mg/mL de transferrina). As meninges e restos celulares foram removidos por sedimentação e o sobrenadante contendo as células dissociadas foi diluído em meio N2 e as células contadas e semeadas na densidade de $0,8 \times 10^6$ células em placas de petri de 100 mm pretratadas com poli-L-orntina e fibronectina (ambas obtidas da sigma). As células foram mantidas em meio N2 na presença de 10 ng/mL de fator de crescimento de fibroblasto (FGF, R&D systems, Minneapolis, MN, USA). O FGF foi adicionado a cada 24 horas e o meio foi trocado a cada 48 horas para manter as células em estado proliferativo e indiferenciado.

Após 5 a 6 dias em cultura ou após atingir uma confluência de até 80 %, as células foram passadas através de raspagem em HBSS para obtenção das células parentais 1 (P1). As células foram diluídas em meio N2, contadas e semeadas conforme a densidade desejada. Para os experimentos em condição proliferativa e indiferenciada, as células foram semeadas na densidade de 2500 células/cm² e cultivadas em meio N2 na presença de FGF durante todo o protocolo experimental. Já para a realização do protocolo de diferenciação neuronal foi utilizada uma densidade de 500 células/cm² e as mesmas foram mantidas em meio N2 na presença de FGF por 72 horas. Então o fator de crescimento foi

removido para induzir diferenciação espontânea das NSC em neurônios após 6 dias em cultura na ausência de FGF.

4.2.3 Protocolos experimentais *in vitro*

Para investigar o efeito dos pesticidas PQ e MB sobre parâmetros de proliferação e diferenciação nas NSC, realizou-se primeiramente um estudo para determinar uma concentração dos pesticidas na qual não houvesse toxicidade (condição de *toxicidade silenciosa*) evidenciada através de testes de viabilidade e morte celular. Após 3 dias em cultura, as células P1 foram expostas a diferentes concentrações dos pesticidas PQ (0,01 – 100 μ M) e MB (0,003 – 10 μ M) ou a 1 μ M de PQ e 1 μ M de MB separadamente ou em associação. Os experimentos foram realizados após 24 horas de exposição aos pesticidas.

Para os estudos de diferenciação, o FGF foi removido após 72 horas e os pesticidas imediatamente adicionados ao meio. Após 24 horas de exposição, o meio contendo os pesticidas foi removido e meio novo, sem FGF, foi adicionado. O meio foi trocado a cada 48 horas e os experimentos realizados após 6 dias de diferenciação. O paraquat foi dissolvido em tampão fosfato salino (PBS) e o MB em DMSO. Os protocolos de tratamento das células estão esquematizados na figura 9.

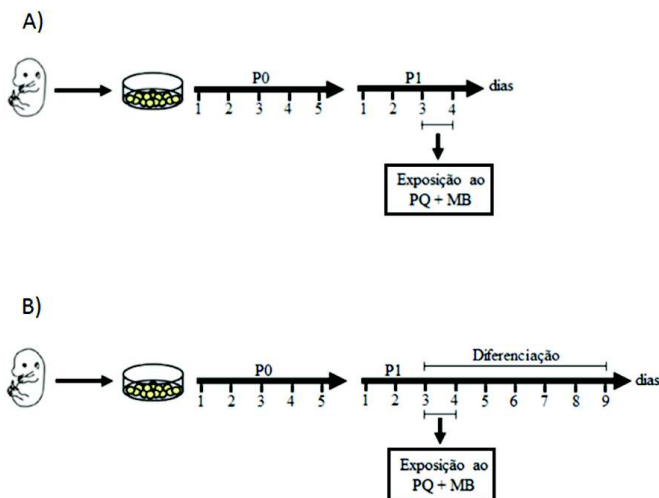


Figura 9. Linha do tempo descritiva para os tratamentos *in vitro*. NSC (P0) foram preparadas a partir de córtices de embriões de rato (E15) e cultivadas na presença de FGF. Após 5-6 dias em cultura, as células P0 foram ressuspensas e semeadas na densidade desejada para obtenção de P1. Após 3 dias, as células foram expostas ao PQ e MB sozinhos ou em combinação durante 24 horas (A). No protocolo de diferenciação (B), o FGF foi removido após 72 horas e as células P1 foram expostas aos pesticidas. Após 24 horas de exposição, os pesticidas foram removidos e as células mantidas até o dia 9.

4.2.4 Ensaios de viabilidade e morte celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método da redução do 3-MTT, segundo (Mosmann, 1983). Em células viáveis, o MTT é reduzido por enzimas desidrogenases mitocondriais a formazan, um composto violeta que pode ser mensurado espectrofotometricamente. Para o teste, as células foram semeadas em placas de 96 poços e após os tratamentos acima mencionados, incubadas com uma solução de MTT 0,5 mg/mL por 1,5 horas a 37°C. A absorbância foi determinada em 540 nm e os resultados expressos em porcentagem do controle. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para o teste de incorporação do iodeto de propídio (IP) as células, provenientes de placas de 24 poços, foram incubadas com uma solução de IP 147 µg/mL durante 20 minutos (Rosa, Sanfeliu *et al.*, 1997). O IP é impermeável em células viáveis, porém é incorporado quando há um dano na membrana celular, ligando-se ao DNA e produzindo

fluorescência vermelha. Após a incubação, as células foram analisadas sob microscópio de fluorescência e 6 diferentes campos foram contados para cada poço. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados finais foram expressos em porcentagem de morte celular em relação a um controle 100 % de morte (células tratadas com uma solução de triton X-100 a 2 % por 5 minutos).

Para avaliar a apoptose, as células foram semeadas em placas de 24 poços e após a exposição aos pesticidas foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com PBS e coradas com Hoechst33342 (1 µg/mL) durante 5 minutos e analisadas em microscópio de fluorescência (Bose, Moors *et al.*, 2010). Seis diferentes campos foram contados para cada poço e as células apoptóticas foram identificadas pela presença de cromatina condensada e fragmentação nuclear. Os experimentos foram feitos em duplicata e o resultado final foi expresso em porcentagem de células apoptóticas.

Todas as imagens foram analisadas em um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ti-SR, Japão) acoplado a um sistema de captura (Nikon Digital sight DS-Qi1Mc) e semiquantificadas utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

4.2.5 Determinação dos níveis de espécies reativas (ER)

As NSC foram semeadas em placas de 96 poços. Após os tratamentos descritos anteriormente, o meio foi removido e as células lavadas com HBSS e então incubadas com 10 µM de 5-(e-6)- carboxi-2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato (carboxi-H₂DCFDA, Image-iT Live Green, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) por 30 minutos a 37°C. Carboxi-H₂DCFDA é hidrolisada por esterases a carboxi-DCFH que, por sua vez reage com ER (de oxigênio e nitrogênio) gerando o produto fluorescente carboxi-DCF (Ali, Lebel *et al.*, 1992). A fluorescência foi mensurada em Fluoroscanner (Fluoroscanner Ascent FL, Thermo Scientific) em 485 nm de excitação e 538 nm de emissão. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados representados em porcentagem do controle.

4.2.6 Determinação do número de células

Para os estudos de proliferação, as células foram incubadas em HBSS conforme protocolo para passagem e então coradas com uma

solução de Azul de Trypan a 4 % e analisadas por microscopia de contraste de fase utilizando câmara de Neubauer para a contagem. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem do controle.

4.2.7 Análise imunocitoquímica

As células foram semeadas em placas de 24 poços e após os tratamentos fixadas em PFA a 4 %, seguido por lavagem em PBS. O bloqueio foi realizado com 0,5 % de albumina de soro bovino (BSA) em PBS contendo 0,3 % de triton X-100 durante 1 hora a temperatura ambiente. As células foram incubadas com anticorpos primários anti-KI-67 (1:300; abcam) ou anti-nestina (1:500; BD Bioscience) a 4 °C *overnight*. Após três lavagens em PBS contendo 0,1 % de triton X-100, as células foram incubadas durante 1 hora com os anticorpos secundários conjugados a FITC anti-camundongo (1:400, Alexa Fluor 594, Life Technologies) ou anti-coelho (1:400, Alexa Fluor 488, Life Technologies). Os núcleos foram corados com Hoechst 33342 por 5 minutos e as imagens capturadas utilizando microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ti-SR, Japão) acoplado a um sistema de captura (Nikon Digital sight DS-Qi1Mc). Foram contados 6 diferentes campos aleatoriamente para cada poço utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

4.2.8 PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)

Após os tratamentos, o RNA total foi extraído utilizando kit de extração de acordo com informações do fabricante (peqGOLD Total RNA Kit, peqlab, VWR international GmbH), incluindo digestão de DNA com solução de DNase (RNase-Free DNase Set, Quiagen) durante 20 minutos a temperatura ambiente. A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada segundo indicação do fabricante (Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, Thermo Scientific). Dois microgramas de cada amostra foram incubados com um mix de reação contendo máxima transcriptase reversa a 25 °C por 10 minutos, 50 °C por 15 minutos e 85 °C por 5 minutos.

O PCR quantitativo em tempo real foi realizado em um sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) utilizando o reagente de detecção SYBR Green Master Mix (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, Thermo Scientific). Os primers foram utilizados numa concentração final de 0,2 µM e o protocolo de amplificação foi de

10 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 56-60 °C por 1 minuto. Os níveis de expressão do RNAm foram normalizados em relação ao gene *housekeeping* e os resultados finais expressos em porcentagem do controle. Na tabela I, apêndice A estão descritas as sequências dos primers utilizados para as análises.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Diferenças entre grupos foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias (com medidas repetidas quando indicado), seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls para os protocolos *in vivo* e Tukey para os estudos *in vitro*. Nos protocolos experimentais 1 e 3 (exposição PN aos pesticidas ou LPS, respectivamente), o teste t de *Student* foi utilizado para avaliar diferença entre dois grupos. Em algumas análises comportamentais foi empregado o teste não-paramétrico de Kruskal -Wallis. Foi também efetuada análise de variância adotando o fator sexo como variável independente, no intuito de avaliar possíveis efeitos sexo-dependentes nos diferentes protocolos experimentais. Tabela com os resultados das análises do fator sexo estão dispostas como apêndices ao final da tese. Todos os dados foram representados como média \pm E.P.M e o nível de significância adotado para os experimentos foi $p < 0,05$. As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando o software Statistica 8.0. (StatSoft, Inc., 2008) e o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), respectivamente.

5. RESULTADOS

5.1 CAPÍTULO I – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AOS PESTICIDAS PQ + MB

Diversos estudos têm apontado para o efeito da exposição perinatal a toxicantes ambientais como causador de *toxicidade silenciosa* no sistema nigroestriatal em desenvolvimento. O objetivo do primeiro capítulo foi avaliar (i) o efeito da exposição PN de camundongos ao paraquat e maneb e (ii) se esses animais expostos posnatalmente aos pesticidas são mais suscetíveis a uma segunda exposição aos mesmos pesticidas na fase adulta, através de parâmetros comportamentais e bioquímicos na SN e no estriado.

5.1.1 A exposição pós-natal de camundongos aos pesticidas PQ + MB causa toxicidade dopaminérgica?

Durante a exposição pós-natal dos filhotes (PN 5-19) ao PQ + MB, o peso corporal dos animais foi monitorado e os dados estão mostrados na figura 10. Podemos observar que a exposição ao PQ + MB não afetou o peso corporal dos animais durante o período de tratamento até o dia PN 30 tanto nos machos [$F_{(1, 44)} = 0,15$; $p = 0,696$] como nas fêmeas [$F_{(1, 44)} = 0,55$; $p = 0,462$], quando os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, sugerindo a ausência de toxicidade sistêmica evidente. Além disso, os filhotes expostos aos pesticidas não apresentaram nenhuma alteração no tempo de abertura dos olhos e não foi observada mortalidade, indicando que não houve toxicidade nestes parâmetros.

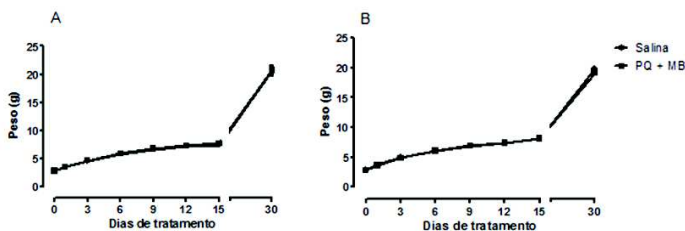


Figura 10. Efeitos da exposição pós-natal ao PQ + MB sobre o peso corporal de camundongos durante o desenvolvimento. Os animais foram expostos diariamente aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e ao maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 ao 19. Os animais controle foram tratados com salina. O ganho de peso dos camundongos machos (A) e fêmeas (B) foi monitorado diariamente entre os dias PN 5 ao 30 e estão representados como média \pm E.P.M. $n= 22-30$

No dia PN 30 os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais a fim de analisar possíveis alterações no sistema motor desses camundongos. A figura 11 mostra os resultados referentes ao teste do campo aberto. A exposição dos camundongos machos e fêmeas ao PQ + MB não causou nenhuma alteração na atividade locomotora e exploratória dos animais, dado pelo número de cruzamentos e levantadas, respectivamente. Além disso, não foram observadas alterações nos testes do *rotarod*, *pole test* e *beam walking* (Figuras 12 e 13). Esses dados indicam que a exposição PN aos pesticidas PQ + MB não causou toxicidade nos parâmetros comportamentais, o que poderia indicar uma possível condição de *toxicidade silenciosa* nesses animais.

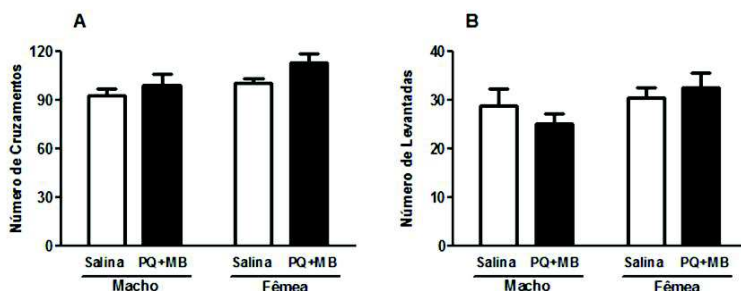


Figura 11. Efeitos da exposição pós-natal ao PQ + MB sobre a atividade locomotora e exploratória no campo aberto. Os animais foram expostos diariamente aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e ao maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 ao 19. Os animais controle foram tratados com salina. O teste do campo aberto foi realizado no dia PN 30. (A) número de cruzamentos e (B) número de levantadas nos camundongos machos e fêmeas. Os dados são representados como média \pm E.P.M. $n = 13-15$.

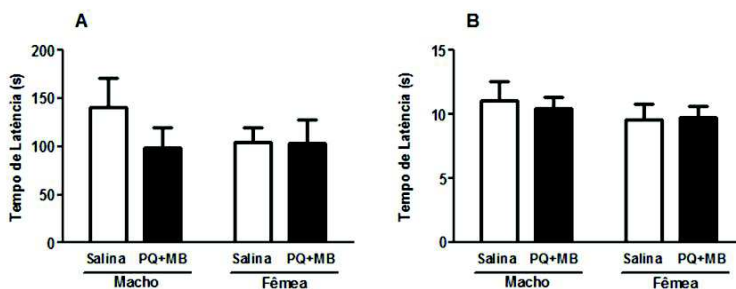


Figura 12. Efeitos da exposição pós-natal ao PQ + MB sobre o desempenho motor no rotarod e no pole test. Os animais foram expostos diariamente aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e ao maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 ao 19. Os animais controle foram tratados com salina. Os testes comportamentais foram realizados no dia PN 30. (A) Tempo de latência para a primeira queda no *rotarod* e (B) tempo de latência para descer do *pole test* nos camundongos machos e fêmeas. Os dados são representados como média \pm E.P.M. $n = 13$ para o *rotarod* e $n=15$ para o *pole test*.

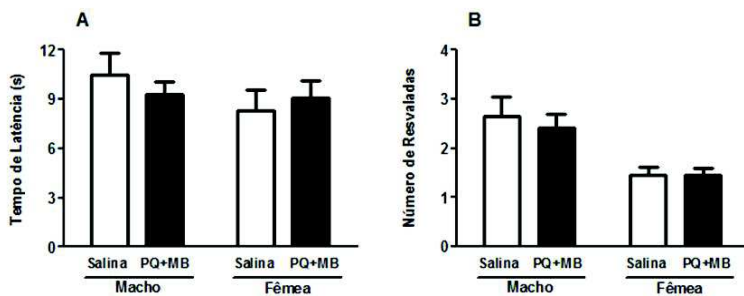


Figura 13. Efeitos da exposição pós-natal ao PQ + MB sobre a coordenação motora dos animais no *beam walking*. Os animais foram expostos diariamente aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e ao maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 ao 19. Os animais controle foram tratados com salina. Os testes comportamentais foram realizados no dia PN 30. (A) Tempo de latência para atravessar o *beam walking* e (B) número de resvaladas nos camundongos machos e fêmeas. Os dados são representados como média \pm E.P.M. $n = 15$

Parâmetros de estresse oxidativo foram também investigados e estão descritos na tabela 1. A exposição aos pesticidas durante o período PN não foi capaz de alterar nenhum dos parâmetros analisados como níveis de TBARS e NPSH, bem como a atividade das enzimas antioxidantes GPx, GR, SOD e catalase no estriado dos camundongos machos e fêmeas. Porém a função mitocondrial, avaliada através da atividade NADH desidrogenase (complexo I) e complexo II da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, foi significativamente alterada nos camundongos machos. A figura 14 mostra que a exposição aos pesticidas PQ + MB durante o período PN de desenvolvimento induziu uma redução na atividade dos complexos I e II, porém apenas nos machos (Figura 14A e B). Esses dados podem sugerir que, apesar da exposição aos pesticidas não induzir alterações comportamentais, ela foi capaz de alterar a função mitocondrial no estriado dos animais, o que pode representar um evento importante na toxicidade desses compostos.

Tabela 1: Parâmetros de estresse oxidativo no estriado de camundongos expostos ao PQ + MB no período PN de desenvolvimento.

| Grupos | TBARS | NPSH | GPx | GR | CAT | SOD |
|---------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| <i>Machos</i> | | | | | | |
| Salina | 2,16 ± 0,06 | 19,04 ± 0,87 | 4,28 ± 0,37 | 13,51 ± 1,11 | 0,36 ± 0,07 | 5,44 ± 0,28 |
| PQ + MB | 1,74 ± 0,15 | 17,14 ± 0,95 | 3,86 ± 0,11 | 11,91 ± 0,45 | 0,26 ± 0,04 | 4,49 ± 0,44 |
| <i>Fêmeas</i> | | | | | | |
| Salina | 1,98 ± 0,60 | 18,49 ± 1,19 | 4,42 ± 0,42 | 13,49 ± 0,73 | 0,24 ± 0,04 | 4,34 ± 0,29 |
| PQ + MB | 2,69 ± 0,35 | 21,20 ± 1,25 | 3,92 ± 0,13 | 12,68 ± 0,50 | 0,25 ± 0,03 | 5,12 ± 0,22 |

As atividades das enzimas GPx e GR são expressas como nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína. A atividade da catalase é expressa como μ mol de H_2O_2 consumido/min/mg de proteína e a atividade da SOD está expressa em unidades de SOD/mg de proteína. O conteúdo de NPSH é expresso como nmol NPSH/mg de proteína e os níveis de TBARS são expressos em nmol de MDA/mg de proteína. Os dados são representados como média \pm E.P.M. n = 5

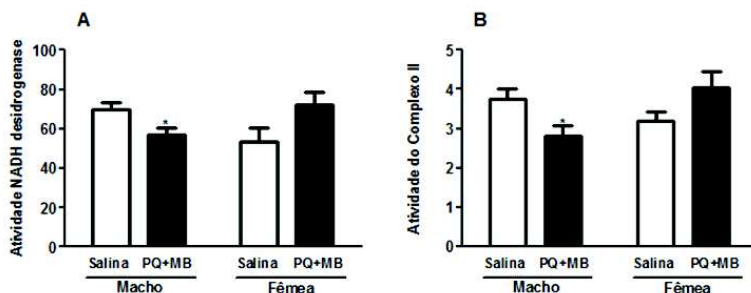


Figura 14. Exposição pós-natal ao PQ + MB diminui a atividade NADH desidrogenase e do complexo II em camundongos machos. Os animais foram expostos diariamente aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e ao maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 ao 19. Os animais controle foram tratados com salina. (A) Atividade NADH desidrogenase - complexo I e (B) atividade do complexo II no estriado dos camundongos machos e fêmeas. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle tratado com salina, através do teste *t* de Student. n = 5

Além do estresse oxidativo e da função mitocondrial, outro parâmetro importante investigado foi a resposta inflamatória. Não houve nenhuma alteração nos níveis de IL-6 e TNF- α no estriado dos camundongos machos e fêmeas (Tabela 2). Entretanto, a exposição aos

pesticidas durante o período PN foi capaz de induzir uma redução de 25,74 e 34,22% no número de neurônios positivos para TH e DAT, respectivamente na *SNpc* de camundongos machos ($p < 0,05$; Figura 15C e 15D). Quando os dados foram avaliados através de ANOVA de duas vias, foi apenas observada uma tendência do fator sexo [$F_{(1,14)} = 3,86$; $p = 0,069$ para TH e $F_{(1,14)} = 3,51$; $p = 0,082$ para DAT; tabela II, apêndice B].

Tabela 2: Níveis de marcadores inflamatórios no estriado de camundongos expostos ao PQ + MB no período PN de desenvolvimento.

| Grupos | IL-6 | TNF-α |
|----------------|------------------|--------------------------------|
| <i>Machos</i> | | |
| Salina | 43,16 \pm 2,74 | 0,61 \pm 0,37 |
| PQ + MB | 48,56 \pm 6,33 | 1,32 \pm 1,01 |
| <i>Fêmeas</i> | | |
| Salina | 42,50 \pm 5,44 | 0,29 \pm 0,29 |
| PQ + MB | 50,08 \pm 5,54 | 1,26 \pm 1,26 |

Os níveis de IL-6 e TNF- α são expressos em fg/mg de proteína. Os dados são representados como média \pm E.P.M. n=5

No estriado dos animais machos a imunomarcção para TH e DAT também foi diminuída significativamente (17,55 e 16,3%; respectivamente; $p < 0,05$; Figura 16C e 16D). Essas alterações não foram observadas nos camundongos fêmeas. Apesar da redução significativa nos níveis de TH e DAT nos machos, não foi observado efeito sexo-dependente nestas variáveis (Tabela III; apêndice C).

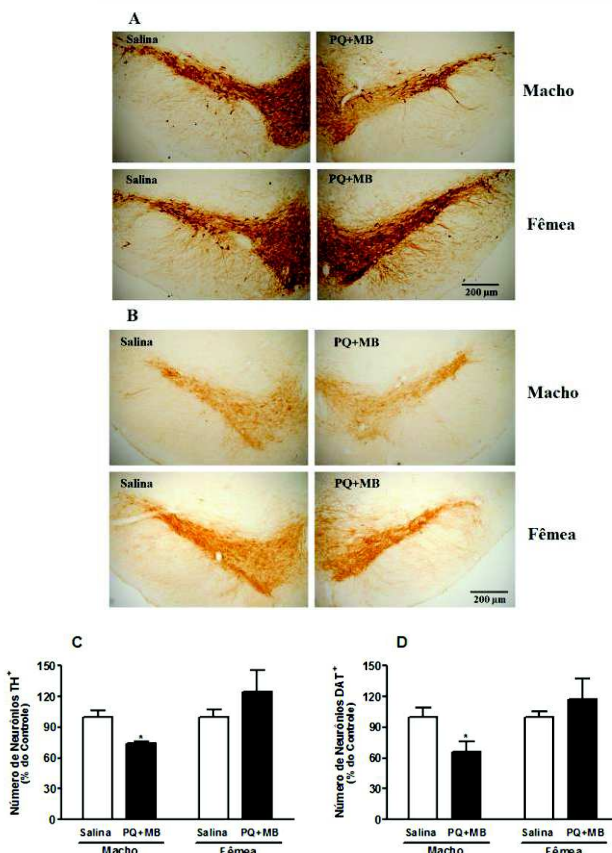


Figura 15. Exposição pós-natal ao PQ + MB diminui o número de neurônios TH⁺ e DAT⁺ na SNpc de camundongos machos. Os animais foram expostos diariamente aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 ao 19. Os animais controle foram tratados com salina. (A) Imagens representativas da imunomarcagem para TH no mesencéfalo ventral contendo SNpc de camundongos machos e fêmeas (escala = 200 μ m). (B) Imagens representativas da imunomarcagem para DAT no mesencéfalo ventral contendo SNpc de camundongos machos e fêmeas (escala = 200 μ m). (C) Quantificação relativa do número de neurônios TH⁺ na SNpc dos camundongos. Os dados são representados como média \pm E.P.M. da porcentagem de neurônios TH⁺ em relação ao grupo controle (machos: 25960 \pm 1674 neurônios; fêmeas: 21670 \pm 1564 neurônios). (D) Quantificação relativa do número de neurônios DAT⁺ na SNpc dos camundongos. Os dados são representados como média \pm E.P.M. da porcentagem de neurônios DAT⁺ em relação ao grupo controle (machos: 20090 \pm 1938 neurônios; fêmeas: 13630 \pm 721 neurônios). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle tratado com salina, através do teste t de *Student*. $n = 4-5$

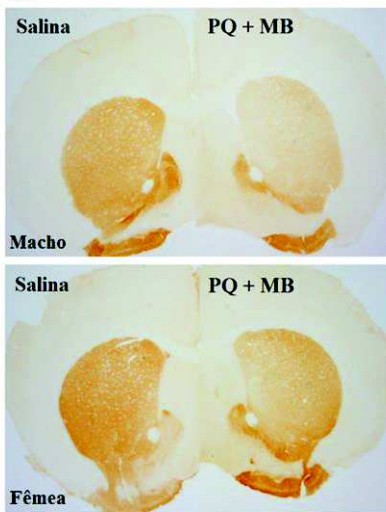
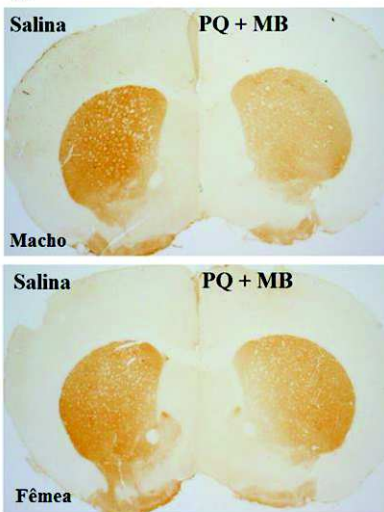
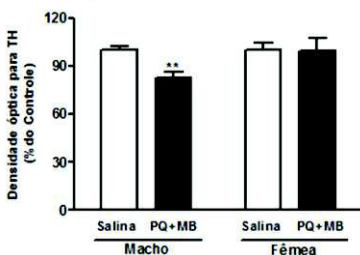
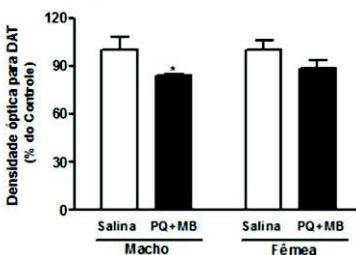
A**B****C****D**

Figura 16. Exposição pós-natal ao PQ + MB diminui a imunomarcção para TH e DAT no estriado de camundongos machos. Os animais foram expostos diariamente aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 ao 19. Os animais controle foram tratados com salina. (A) Imagens representativas da imunomarcção para TH no estriado de camundongos machos e fêmeas. (B) Imagens representativas da imunomarcção para DAT no estriado de camundongos machos e fêmeas. (C) Quantificação relativa da densidade óptica (DO) para a TH no estriado dos camundongos. (D) Quantificação relativa da DO para DAT no estriado dos camundongos. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle tratado com salina, através do teste t de *Student*. $n = 4-5$

5.1.2 Camundongos expostos posnatalmente ao PQ e MB são mais suscetíveis a uma segunda exposição aos mesmos pesticidas na vida adulta?

Após a exposição pós-natal aos pesticidas, os animais foram mantidos até os 3 meses de idade e então submetidos a uma segunda exposição aos mesmos toxicantes ou à salina. A segunda exposição aos pesticidas causou mortalidade nos animais machos de 18,19% no grupo exposto ao PQ + MB somente na vida adulta ($p= 0,038$) e de 40% no grupo exposto aos pesticidas no período pós-natal e reexposto na vida adulta ($p= 0,0011$), em relação ao grupo controle somente tratado com salina em ambas as exposições. Nas fêmeas também houve uma mortalidade de 14,29% no grupo exposto ao PQ + MB somente na vida adulta ($p= 0,083$) e de 26,32% no grupo exposto aos pesticidas no período pós-natal e reexposto na vida adulta ($p= 0,015$) em relação ao grupo controle. Em ambos os sexos as mortes ocorreram entre a segunda e a sexta semana de exposição (Figura 17).

A tabela 3 mostra que a exposição aos pesticidas na vida adulta não alterou o peso corporal dos animais em nenhum dos grupos avaliados. Apesar da ausência de alterações no peso corporal, a mortalidade que ocorreu na segunda exposição pode estar relacionada à toxicidade sistêmica desses compostos. Porém marcadores periféricos de toxicidade não foram avaliados no presente estudo.

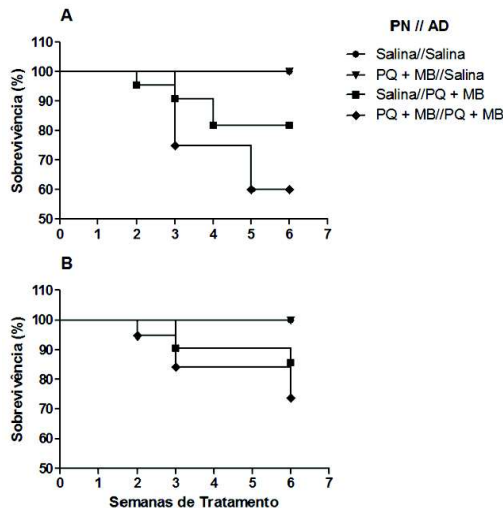


Figura 17. Curva de sobrevivência dos animais expostos posnatalmente ao PQ + MB e reexpostos aos mesmos pesticidas na vida adulta. Os animais foram expostos aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 ao 19. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram reexpostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. (A) Curva de sobrevivência nos machos e (B) curva de sobrevivência nas fêmeas. Os dados estão representados como porcentagem de sobrevivência. PN: pós-natal, AD: adulto. Machos: n = 20-22; fêmeas: n= 18-21.

Tabela 3. Peso corporal dos animais expostos posnatalmente ao PQ + MB e reexpostos aos mesmos pesticidas na vida adulta.

| Grupos | Peso corporal (g) | |
|--------------------|-------------------|-------------|
| | Machos | Fêmeas |
| PN // AD | | |
| Salina // Salina | 48,40± 1,38 | 40,38± 0,90 |
| PQ + MB // Salina | 47,8± 1,22 | 39,08± 0,97 |
| Salina // PQ + MB | 47,45± 1,18 | 39,00± 1,44 |
| PQ + MB // PQ + MB | 48,11± 1,80 | 38,70± 1,05 |

Os dados são representados como média ± E.P.M. PN: pós-natal, AD: adulto. Machos: n= 12-22; fêmeas: n= 14-20.

Os efeitos da segunda exposição ao PQ + MB no teste do campo aberto estão ilustrados na Figura 18. Os animais que foram tratados previamente com salina ou PQ + MB e posteriormente reexpostos aos pesticidas apresentaram redução significativa no número de cruzamentos e na atividade exploratória (número de levantadas) tanto nos machos como nas fêmeas (Figura 18A-D). A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo da segunda exposição no número de cruzamentos [$F_{(1,65)} = 10,95$; $p = 0,0015$] e [$F_{(1,64)} = 14,58$; $p = 0,00030$], nos camundongos machos e fêmeas, respectivamente. Esses resultados indicam que a exposição pós-natal aos pesticidas não alterou a resposta dos animais a uma segunda exposição aos mesmos toxicantes na vida adulta no teste do campo aberto.

Por outro lado, os camundongos machos tratados com PQ + MB no período PN e reexpostos aos pesticidas na vida adulta, mostraram um déficit motor no teste do *rotarod* evidenciado pela diminuição do tempo de latência para a primeira queda ($p < 0,01$, Figura 19A) e pelo aumento no número de quedas ($p < 0,05$; Figura 19B). Não foram observadas alterações nos animais expostos aos pesticidas somente no período PN ou somente na vida adulta. Por outro lado, nas fêmeas apenas foram observadas alterações significativas no grupo exposto aos pesticidas somente na vida adulta, onde foi evidenciado aumento significativo no número de quedas ($p < 0,05$; Figura 19D). O déficit motor observado nos machos expostos aos pesticidas em ambos os períodos (PN + adulto) pode indicar uma possível sensibilização dos camundongos previamente expostos durante o desenvolvimento. Apesar dos animais expostos ao PQ + MB apenas durante o desenvolvimento não apresentarem nenhuma alteração comportamental, quando esses animais são submetidos a uma segunda exposição aos pesticidas, alterações comportamentais são observadas.

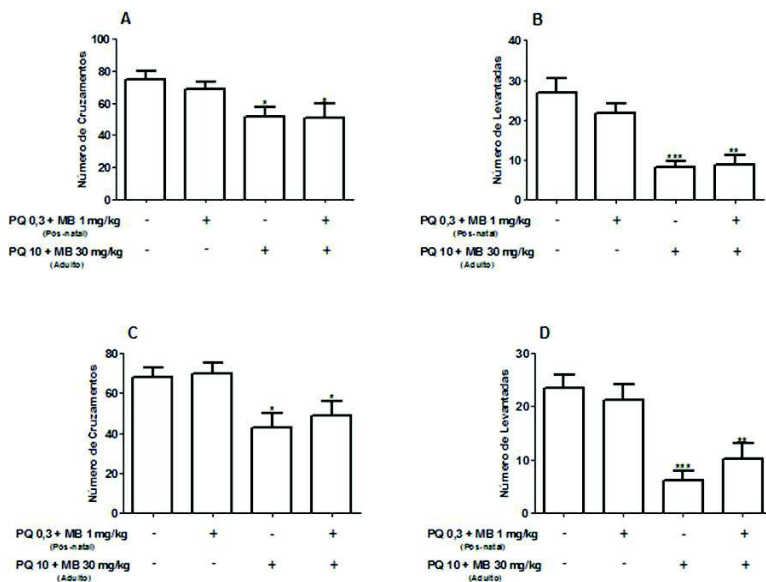


Figura 18. Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre a atividade locomotora e exploratória no campo aberto. Os animais foram expostos aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 ao 19. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram reexpostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. O teste do campo aberto foi realizado uma semana após a última exposição nos animais adultos. (A) Número de cruzamentos e (B) número de levantadas nos camundongos machos, (C) número de cruzamentos e (D) número de levantadas nas fêmeas. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle tratado apenas com salina, através de ANOVA de duas vias, seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls para o número de cruzamentos. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para o número de levantadas. Machos: $n = 12-20$; fêmeas: $n = 13-20$.

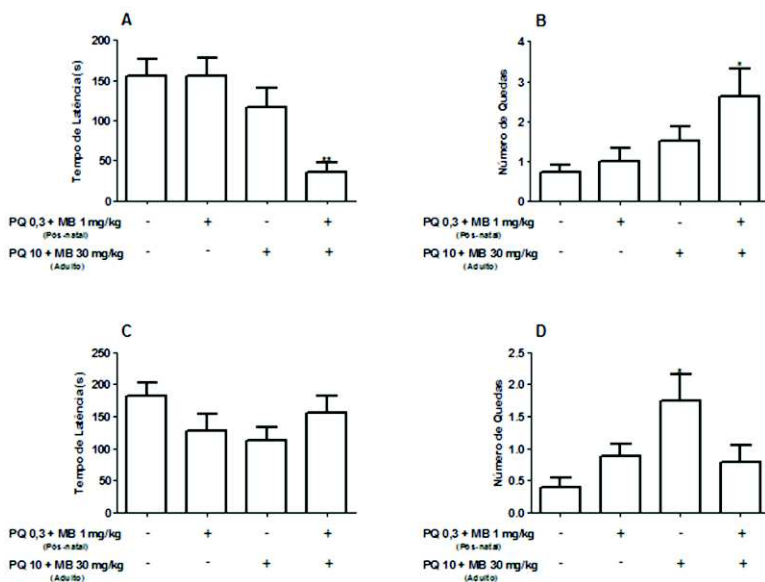


Figura 19. Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre o desempenho motor no *rotarod*. Os animais foram expostos aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 a 19. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram reexpostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. O teste do *rotarod* foi realizado uma semana após a última exposição nos animais adultos. (A) Tempo de latência para a primeira queda e (B) número de quedas nos camundongos machos, (C) tempo de latência para primeira queda e (D) número de quedas nas fêmeas. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle tratado apenas com salina, através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Machos: $n = 11-19$; fêmeas: $n = 14-18$.

Além do *rotarod*, foi utilizado o teste do *beam walking* para avaliar a coordenação motora e equilíbrio motor dos animais. Na figura 20A está representado o tempo de latência para atravessar o *beam walking* nos camundongos machos, onde não foram observadas alterações em nenhum dos grupos experimentais. Porém, quando avaliamos o número de resvaladas, podemos constatar que os animais machos expostos posnatalmente ao PQ + MB e reexpostos aos toxicantes na vida adulta apresentaram aumento significativo no número de resvaladas ($p < 0,001$; Figura 20B), corroborando os achados no teste do *rotarod*. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo tanto da exposição pós-natal [$F_{(1,40)} = 19,28$; $p = 0,0031$] quanto da segunda exposição na vida adulta [$F_{(1,40)} = 6,11$; $p = 0,017$] para o número de resvaladas. Além disso, o aumento no número de resvaladas no grupo exposto aos pesticidas em ambos os períodos foi significativamente diferente dos grupos tratados com os pesticidas somente posnatalmente ou na vida adulta (Figura 20 B). Já nas fêmeas, houve um aumento significativo no tempo de latência ($p < 0,01$; Figura 20C) no grupo exposto aos pesticidas somente na vida adulta. Além disso, houve um aumento no número de resvaladas no grupo exposto aos pesticidas somente na vida adulta e no grupo exposto aos pesticidas em ambos os períodos ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente; Figura 20D).

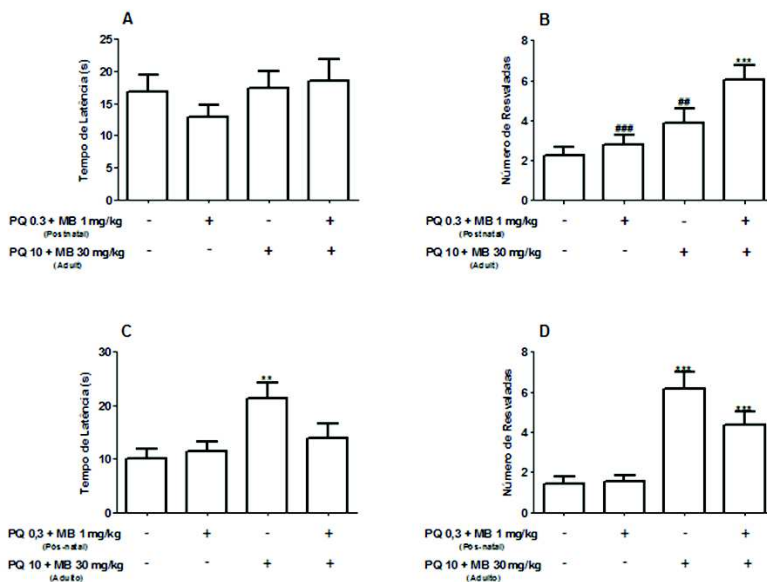


Figura 20. Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre a coordenação motora dos animais no *beam walking*. Os animais foram expostos aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 a 19. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram reexpostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. O teste do *beam walking* foi realizado uma semana após a última exposição nos animais adultos. (A) Tempo de latência para atravessar o *beam walking* e (B) número de resvaladas nos camundongos machos, (C) tempo de latência para atravessar o *beam walking* e (D) número de resvaladas nas fêmeas. Os dados são representados como média \pm E.P.M. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle tratado apenas com salina. ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo exposto aos pesticidas no período PN e na vida adulta, através de ANOVA de duas vias, seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Machos: $n = 9-13$; fêmeas: $n = 10-13$.

A figura 21 mostra os resultados referentes ao teste do *single pellet*. Podemos observar que houve uma diminuição significativa na taxa de sucessos para alcançar a pastilha de ração nos camundongos expostos aos pesticidas no período pós-natal e reexpostos na fase adulta em relação ao grupo tratado apenas com salina em ambas as exposições (machos, $p < 0,001$ e fêmeas, $p < 0,05$). Nos machos, essa redução na taxa de sucessos no grupo exposto aos pesticidas em ambos os períodos

foi significativamente diferente dos grupos tratados com os pesticidas somente posnatalmente ou na vida adulta ($p < 0,01$). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da primeira exposição (PN) [$F_{(1,59)} = 15,25$; $p = 0,00024$] e da segunda exposição na vida adulta [$F_{(1,59)} = 12,16$; $p = 0,00092$] para os animais machos. Já para as fêmeas, houve apenas um efeito significativo da segunda exposição [$F_{(1,60)} = 7,54$; $p = 0,0079$]. De fato, a análise de variância com o fator sexo como variável independente mostrou um efeito do sexo para a taxa de sucessos no *single pellet* [$F_{(1,119)} = 5,80$; $p = 0,017$] (Tabela III; apêndice C).

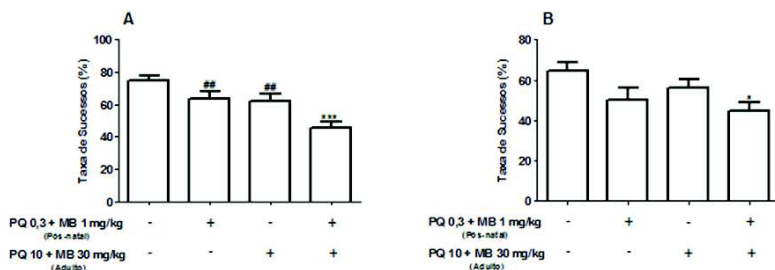


Figura 21. Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre o desempenho dos animais no teste do *single pellet*. Os animais foram expostos aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 a 19. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram reexpostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. O teste do *single pellet* foi realizado uma semana após a última exposição nos animais adultos. (A) Taxa de sucessos nos camundongos machos e (B) taxa de sucessos nas fêmeas. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle tratado apenas com salina, ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo exposto aos pesticidas no período PN e na vida adulta através de ANOVA de duas vias, seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Machos: $n = 11-19$; fêmeas: $n = 13-19$.

Considerando que, (i) a função mitocondrial é importante no SNC, e que (ii) a exposição PN ao PQ + MB foi capaz de induzir uma diminuição na atividade dos complexos I e II mitocondrial nos camundongos machos; posteriormente investigamos a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial no estriado dos animais após a segunda exposição aos pesticidas. A exposição aos pesticidas na vida adulta não alterou a atividade dos complexos I e II em nenhum dos grupos experimentais avaliados (Figura 22 A-D). Até mesmo a diferença

na atividade dos complexos que foi observada nos animais machos, após a primeira exposição, no dia PN 30, não foi evidenciada nos animais adultos (grupo exposto posnatalmente ao PQ + MB e reexposto à salina na vida adulta). Esses dados indicam que a reexposição aos pesticidas não alterou a função mitocondrial no estriado dos animais.

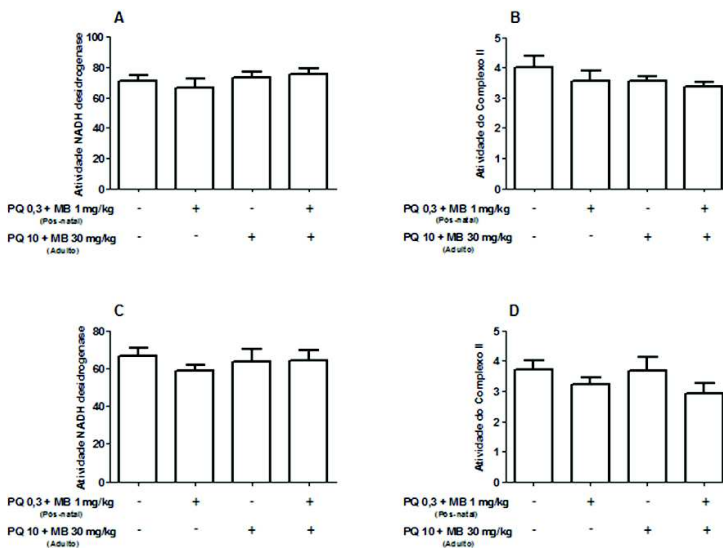
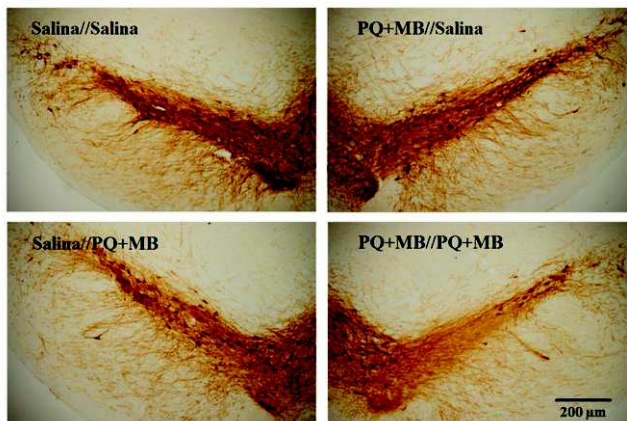
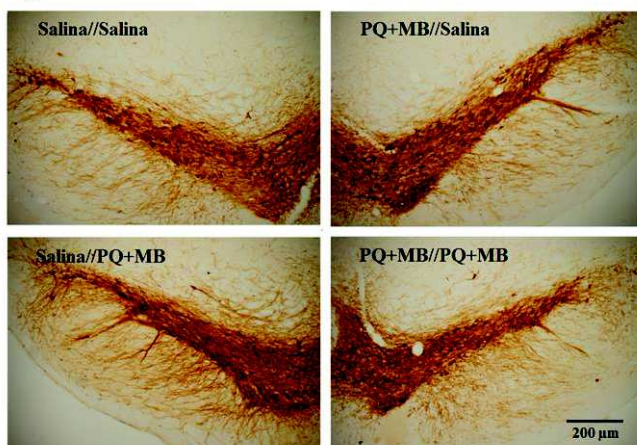


Figura 22. Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre a atividade NADH desidrogenase e do complexo II em camundongos. Os animais foram expostos aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 a 19. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram reexpostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. (A) Atividades NADH desidrogenase e (B) atividade do complexo II nos camundongos machos, (C) atividades NADH desidrogenase e (D) atividade do complexo II nos camundongos fêmeas. As atividades NADH desidrogenase e do complexo II foram mensuradas no estriado uma semana após a última exposição nos animais adultos e são expressas em nmol/min/mg de proteína. Os dados são representados como média \pm E.P.M. $n = 7$

Como o déficit motor evidenciado nos testes comportamentais pode estar relacionado à morte de neurônios dopaminérgicos, o próximo passo foi analisar o número de neurônios TH e DAT positivos na SN_{pc}, bem como a imunomarcagem para estes marcadores no estriado. A figura 23 mostra uma diminuição de 49,98% no número de neurônios TH⁺ na

SNpc dos camundongos machos expostos aos pesticidas no período pós-natal e reexpostos na fase adulta em relação ao grupo controle ($p < 0,01$; Figura 23A e C). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da primeira exposição (PN) [$F_{(1,16)} = 11,67$; $p = 0,0035$] e da segunda exposição [$F_{(1,16)} = 6,15$; $p = 0,024$] no número de neurônios TH⁺ para os animais machos. Além disso, houve uma redução nos neurônios TH⁺ no grupo exposto aos pesticidas somente durante o desenvolvimento (20,1%; $p = 0,11$), bem como no grupo exposto somente na fase adulta (28,04 %, $p = 0,07$) em relação ao controle. Como foi evidenciado uma redução nos neurônios TH⁺ nos camundongos após a exposição PN aos pesticidas (protocolo experimental 1), um teste *t* de Student foi realizado para investigar se ainda havia uma possível diferença entre o grupo exposto ao PQ + MB posnatalmente seguido de uma segunda exposição à salina em relação ao grupo apenas tratado com salina em ambos os períodos. O teste *t* mostrou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,015$), indicando que a redução nos neurônios TH⁺, observada após a exposição PN, se manteve na vida adulta. E, quando os animais receberam um segundo desafio (segunda exposição aos pesticidas) a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc foi pontencializada e esses animais passaram a apresentar alterações comportamentais significativas. Já nos camundongos fêmeas não foram encontradas alterações significativas. A análise de variância com o fator sexo como variável independente mostrou um efeito do sexo para a marcação de neurônios TH⁺ na SNpc [$F_{(1,31)} = 7,51$; $p = 0,01$] (Tabela III; apêndice C).

A**B**

(Continuação da figura e legenda na próxima página)

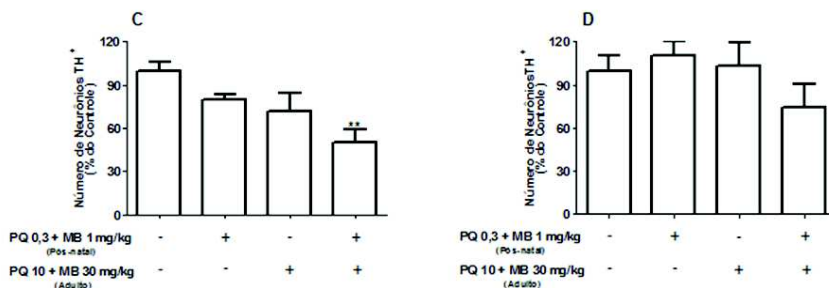
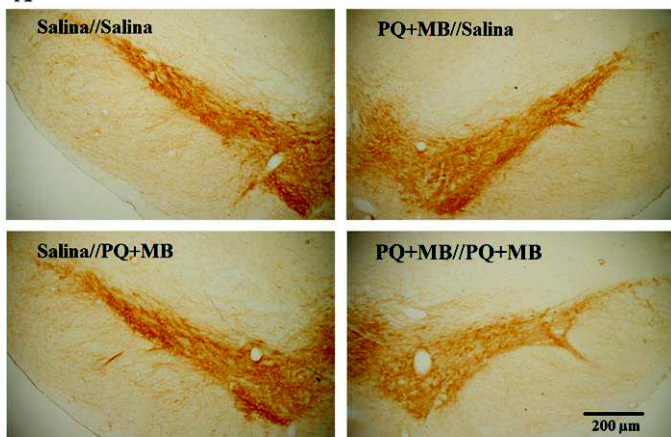
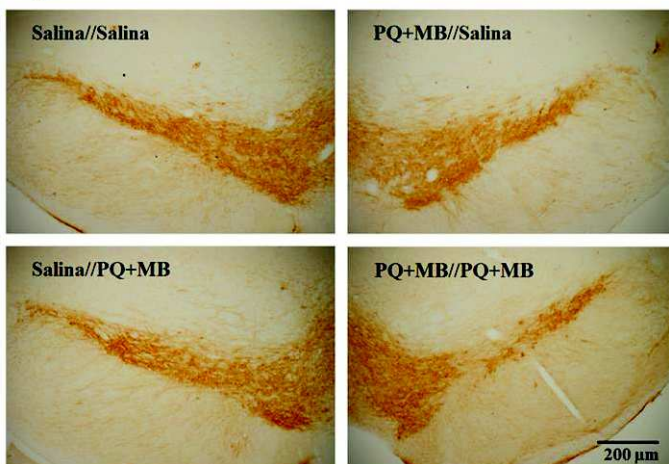


Figura 23. Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre o número de neurônios TH⁺ na SNpc. Os animais foram expostos aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 a 19. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram reexpostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. Imagens representativas da imunomarcagem para TH no mesencéfalo ventral contendo SNpc de camundongos machos (A) e fêmeas (B) (escala = 200 μ m). Quantificação relativa do número de neurônios TH⁺ na SNpc dos camundongos machos (C) e fêmeas (D). Os dados são representados como média \pm E.P.M. da porcentagem de neurônios TH⁺ em relação ao grupo controle (machos: 16730 \pm 299,9 neurônios; fêmeas: 12740 \pm 1334 neurônios). ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle tratado apenas com salina através da análise de ANOVA de duas vias, seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. $n = 3-6$

Além disso, houve uma redução de 50,54% no número de neurônios DAT⁺ na SNpc dos animais machos expostos aos pesticidas durante o desenvolvimento e reexpostos na vida adulta ($p < 0,05$; Figura 24C). Foram observados efeitos significativos da primeira [$F_{(1,16)} = 5,40$; $p = 0,033$] e da segunda [$F_{(1,16)} = 5,48$, $p = 0,032$] exposição para os animais machos. Já os grupos expostos aos toxicantes apenas no período PN ou quando adultos, apresentaram uma redução em torno 17% para ambos os grupos ($p = 0,49$ e $p = 0,27$, respectivamente). Entretanto, quando comparado o grupo exposto aos pesticidas apenas no período PN em relação ao grupo controle, também foi evidenciado diferença significativa entre os grupos através do teste t de Student para os neurônios DAT⁺ ($p = 0,026$). Indicando, desta forma, que a redução na marcação para DAT na SNpc observada nesses animais, no PN 30, ainda pode ser observada na fase adulta. Nas fêmeas, não houveram alterações significativas entre os grupos.

A**B**

(Continuação da figura e legenda na próxima página)

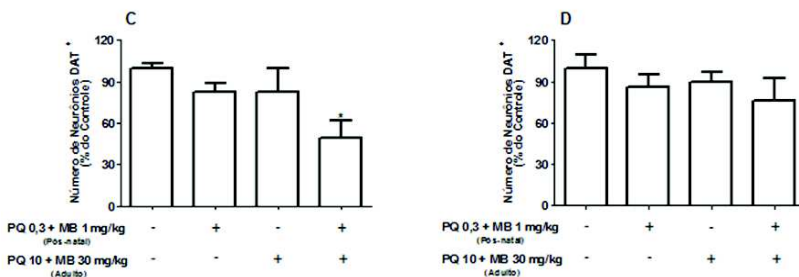


Figura 24. Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre o número de neurônios DAT⁺ na SNpc. Os animais foram expostos aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 a 19. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram reexpostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. Imagens representativas da imunomarcagem para DAT no mesencéfalo ventral contendo SNpc de camundongos machos (A) e fêmeas (B) (escala = 200 μ m). Quantificação relativa do número de neurônios DAT⁺ na SNpc dos camundongos machos (C) e fêmeas (D). Os dados são representados como média \pm E.P.M. da porcentagem de neurônios DAT⁺ em relação ao grupo controle (machos: $14620 \pm 520,4$ neurônios; fêmeas: 14270 ± 1331 neurônios). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle tratado apenas com salina através de ANOVA de duas vias, seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. $n = 3-6$

A imunomarcagem para TH e DAT foi avaliada também no estriado dos camundongos. As figuras 25 e 26 mostram que a exposição ao PQ + MB não afetou os níveis das proteínas TH e DAT em nenhum dos sexos. Da mesma forma, os níveis de dopaminas no estriado dos animais não foram modificados pela exposição aos pesticidas, como pode-se observar na tabela 4.

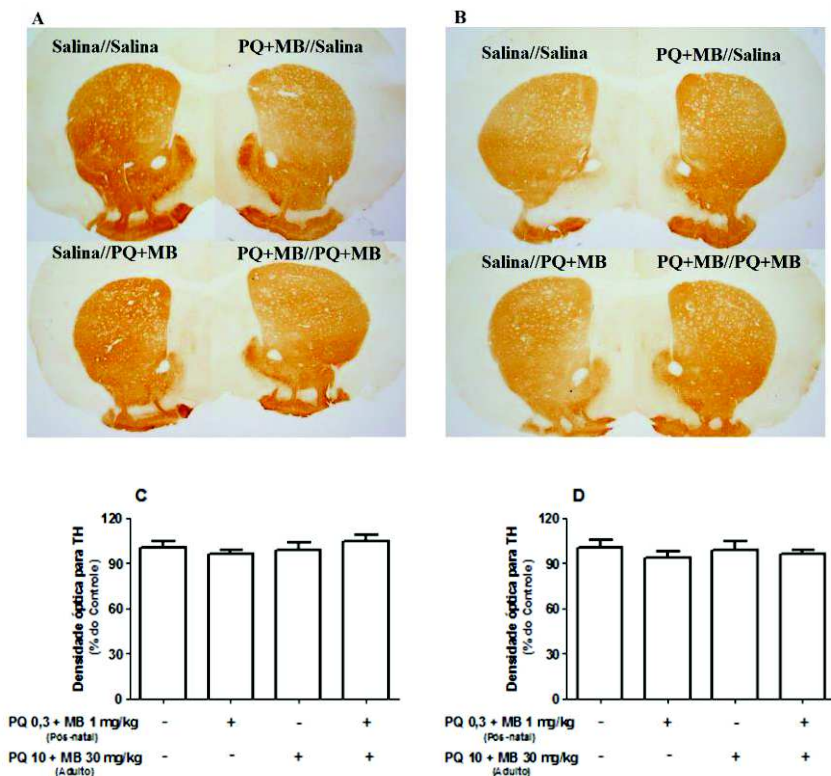


Figura 25. Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre a imunomarcacão para TH no estriado. Os animais foram expostos aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 a 19. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram reexpostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. Imagens representativas da imunomarcacão para TH no estriado de camundongos machos (A) e fêmeas (B). Quantificacão relativa da densidade óptica (DO) para TH no estriado dos camundongos machos (C) e fêmeas (D). Os dados são representados como média \pm E.P.M. n= 3-6

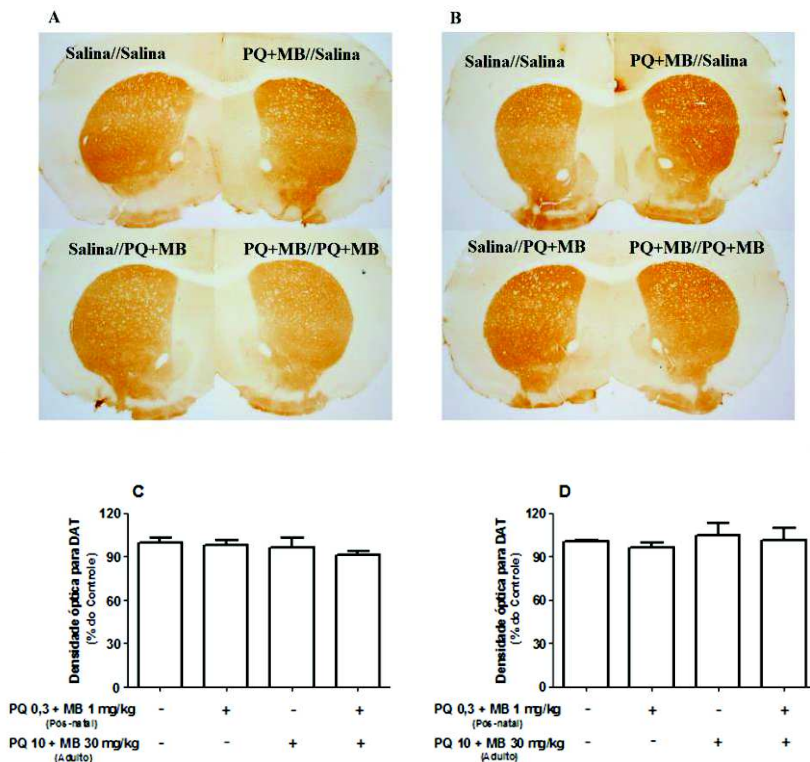


Figura 26. Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre a imunomarcagem para DAT no estriado. Os animais foram expostos aos pesticidas paraquat (0,3 mg/kg, s.c.) e maneb (1 mg/kg, s.c.) entre os dias PN 5 a 19. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram reexpostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. Imagens representativas da imunomarcagem para DAT no estriado de camundongos machos (A) e fêmeas (B). Quantificação relativa da densidade óptica (DO) para DAT no estriado dos camundongos machos (C) e fêmeas (D). Os dados são representados como média \pm E.P.M. $n = 3-6$

Tabela 4. Efeitos da reexposição ao PQ + MB na vida adulta sobre os níveis de dopamina no estriado.

| Grupos | Dopamina (µg/g tecido) | |
|---------------------------|-------------------------------|---------------|
| | Macho | Fêmea |
| <i>PN // AD</i> | | |
| Salina // Salina | 365,0 ± 128,3 | 526,5 ± 108,8 |
| PQ + MB // Salina | 338,5 ± 132,0 | 496,0 ± 192,2 |
| Salina // PQ + MB | 554,2 ± 119,2 | 527,6 ± 259,5 |
| PQ + MB // PQ + MB | 219,7 ± 119,2 | 480,3 ± 179,1 |

Os níveis de dopamina são expressos em µg/g de tecido. Os dados são representados como média ± E.P.M. n=5

5.2 CAPÍTULO II - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO LPS

Além da exposição a pesticidas, o processo inflamatório também tem sido relacionado com toxicidade no sistema nigroestriatal em desenvolvimento. O objetivo do segundo capítulo foi avaliar (i) o efeito da exposição PN de camundongos ao LPS e (ii) se esses animais expostos ao LPS posnatalmente são mais suscetíveis a uma exposição a pesticidas na fase adulta através de parâmetros comportamentais e bioquímicos na substância negra e no estriado.

5.2.1 A exposição pós-natal de camundongos ao LPS causa toxicidade dopaminérgica?

A exposição ao LPS causou uma mortalidade de aproximadamente 17% nos machos e de 15% nas fêmeas entre 24 e 96 horas após a primeira administração (PN 5). Quando as curvas de sobrevivência foram comparadas através do teste Long-rank (Mantel-Cox) observamos diferença significativa entre o grupo tratado com LPS e os animais controle (machos; $p = 0,0013$ e fêmeas; $p = 0,0019$; Figura 27).

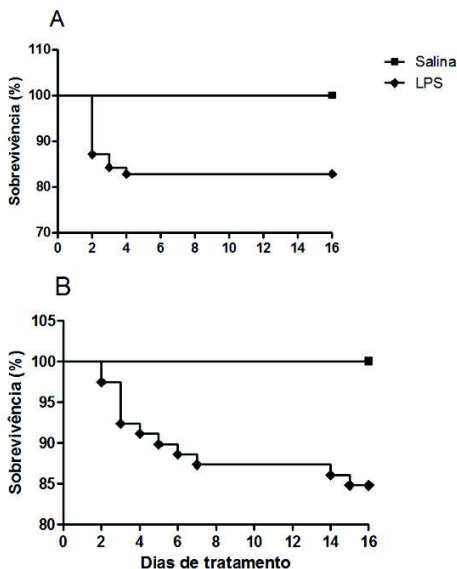


Figura 27. Curva de sobrevivência após a exposição pós-natal ao LPS em camundongos. Os animais foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias PN 5 e 10. Os animais controle foram tratados com salina. Curva de sobrevivência nos machos (A) e nas fêmeas (B). Os dados estão representados como porcentagem de sobrevivência. Machos; n= 55-70; fêmeas: n= 59-79.

Além disso, os animais sobreviventes apresentaram uma diminuição no peso corporal, 24 horas após a exposição ao LPS, no dia PN 5 em relação ao controle, e esta diferença se manteve até o dia PN 30 nos camundongos machos [$F_{(1,44)} = 134,45$; $p < 0,001$] e nas fêmeas [$F_{(1,44)} = 32,79$; $p = 0,000001$]. Além disso, a análise de variância com medida repetida mostrou uma interação significativa tempo *versus* tratamento tanto nos machos como nas fêmeas [$F_{(7,44)} = 43,39$; $p < 0,001$] e [$F_{(7,44)} = 19,48$; $p < 0,001$], respectivamente (Figura 28).

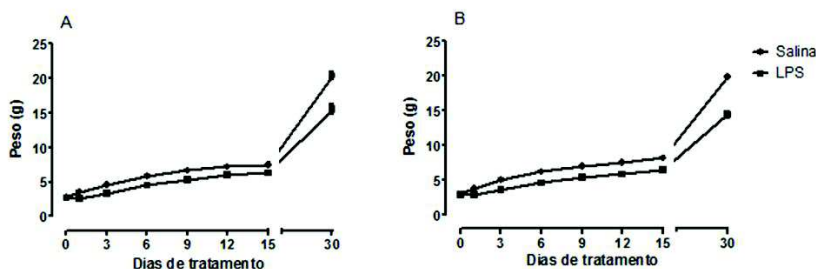


Figura 28. Exposição pós-natal ao LPS diminui o peso corporal de camundongos durante o desenvolvimento. Os animais foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias PN 5 e 10. Os animais controle foram tratados com salina. O ganho de peso dos camundongos machos (A) e fêmeas (B) foi monitorado diariamente entre os dias PN 5 ao 30 e estão representados como média \pm E.P.M. $n = 22-24$

A figura 29 mostra um aumento significativo na atividade locomotora e exploratória dos animais no teste do campo aberto. Esse efeito foi observado pelo aumento no número de cruzamentos e levantadas, tanto nos animais machos como nas fêmeas ($p < 0,001$; Figura 29A e B). Foi avaliada também a coordenação motora e equilíbrio motor dos animais no teste do *beam walking*. Apesar do tempo de latência para atravessar a viga ser igual entre os animais tratados com LPS e salina, houve um aumento significativo no número de resvaladas nos animais expostos ao LPS, em ambos os sexos (Figura 30B). Os camundongos expostos ao LPS também apresentaram uma diminuição significativa no tempo de latência para a primeira queda no teste do *rotarod*, o que pode sugerir um déficit na coordenação motora dos animais (Figura 31A).

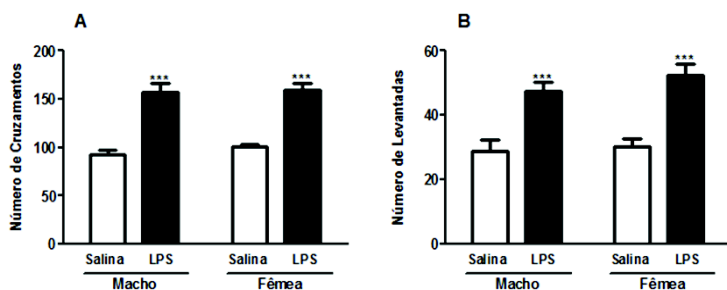


Figura 29. Exposição pós-natal ao LPS causa hiperatividade no campo aberto. Os animais foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias PN 5 e 10. Os animais controle foram tratados com salina. O teste do campo aberto foi realizado no dia PN 30. (A) Número de cruzamentos e (B) número de levantadas nos camundongos machos e fêmeas. Os dados são representados como média ± E.P.M. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle tratado com salina, através do teste *t* de Student. $n = 13$

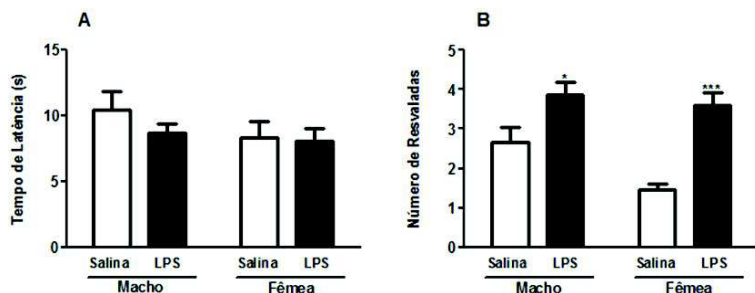


Figura 30. Efeitos da exposição pós-natal ao LPS sobre a coordenação motora dos animais no beam walking. Os animais foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias PN 5 e 10. Os animais controle foram tratados com salina. Os testes comportamentais foram realizados no dia PN 30. (A) Tempo de latência para atravessar o beam walking e (B) número de resvaladas nos camundongos machos e fêmeas. Os dados são representados como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle tratado com salina, através do teste *t* de Student. $n = 15$

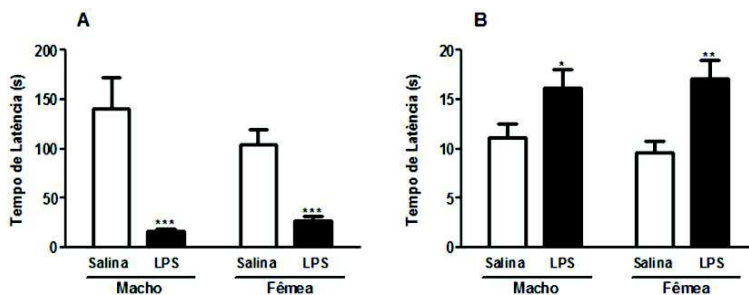


Figura 31. Efeitos da exposição pós-natal ao LPS sobre o desempenho motor no *rotarod* e no *pole test*. Os animais foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias PN 5 e 10. Os animais controle foram tratados com salina. Os testes comportamentais foram realizados no dia PN 30. (A) Tempo de latência para a primeira queda no *rotarod* e (B) tempo de latência para a descida no *pole test* nos machos e fêmeas. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle tratado com salina, através do teste *t* de Student. *Rotarod*: $n = 13$; *pole test*: $n = 15$.

Além disso, os animais apresentaram um aumento no tempo de latência para descer do poste no *pole test* (Figura 31B). O *pole test* avalia bradicinesia que está relacionado com a prolongação do tempo para execução do movimento. Esses dados comportamentais sugerem que a administração do LPS foi capaz de induzir toxicidade nesses animais.

Com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos nas alterações comportamentais, o papel do estresse oxidativo e da função mitocondrial nos animais expostos ao LPS foram investigados. Como pode ser observado, a administração do LPS não causou alterações relacionadas ao estresse oxidativo (Tabela 5), bem como não foi capaz modificar as atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Tabela 6).

Tabela 5: Parâmetros de estresse oxidativo no estriado de camundongos expostos ao LPS no período pós-natal de desenvolvimento.

| Grupos | TBARS | NPSH | GPx | GR | CAT | SOD |
|---------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| <i>Machos</i> | | | | | | |
| Salina | 2,16 ± 0,06 | 19,04 ± 0,87 | 4,28 ± 0,37 | 13,51 ± 1,11 | 0,36 ± 0,07 | 5,44 ± 0,28 |
| LPS | 2,61 ± 0,38 | 21,04 ± 0,89 | 3,95 ± 0,14 | 12,63 ± 0,12 | 0,18 ± 0,04 | 4,89 ± 0,39 |
| <i>Fêmeas</i> | | | | | | |
| Salina | 1,98 ± 0,60 | 18,49 ± 1,19 | 4,42 ± 0,42 | 13,49 ± 0,73 | 0,24 ± 0,04 | 4,34 ± 0,29 |
| LPS | 1,49 ± 0,20 | 19,12 ± 1,48 | 3,81 ± 0,27 | 11,84 ± 0,49 | 0,19 ± 0,04 | 4,64 ± 0,33 |

As atividades das enzimas glutatona peroxidase (GPx) e da glutatona redutase (GR) são expressas como nmol de NADPH oxidado/min/mg proteína. A atividade da catalase (CAT) é expressa como μmol de H_2O_2 consumido/min/mg proteína e a atividade da superóxido dismutase (SOD) está expressa em unidades de SOD/mg de proteína. O conteúdo de NPSH é expresso como nmol NPSH/mg proteína e os níveis de TBARS são expressos em nmol de MDA/mg de proteína. Os dados são representados como média ± E.P.M. n = 5

Tabela 6: Atividade NADH desidrogenase (complexo I) e do complexo II no estriado de camundongos expostos ao LPS no período pós-natal de desenvolvimento.

| Grupos | Complexo I | Complexo II |
|---------------|---------------|-------------|
| <i>Machos</i> | | |
| Salina | 69,97 ± 3,14 | 3,74 ± 0,26 |
| LPS | 71,37 ± 9,76 | 3,97 ± 0,44 |
| <i>Fêmeas</i> | | |
| Salina | 53,74 ± 6,493 | 3,18 ± 0,24 |
| LPS | 61,50 ± 6,86 | 3,59 ± 0,07 |

A atividade NADH desidrogenase e do complexo II são expressas em nmol/min/mg de proteína. Os dados são representados como média ± E.P.M. n = 5

Considerando a inflamação como evento primário no efeito tóxico do LPS, fomos investigar se a administração do LPS nos dias PN 5 e 10 era capaz de induzir aumento nos níveis de marcadores inflamatórios no estriado dos camundongos, como um possível mecanismo envolvido nas alterações comportamentais. Podemos observar na figura 32 um aumento significativo nos níveis de IL-6 e

TNF- α nos camundongos machos no dia PN 30. Já nos camundongos fêmeas, houve um aumento significativo apenas nos níveis de TNF- α . Baseado nesses resultados, podemos inferir que o processo inflamatório induzido pelas administrações do LPS (dia PN 5 e 10) foi capaz de causar um aumento nos níveis de IL-6 e TNF- α que persistiram pelo menos até o dia PN 30.

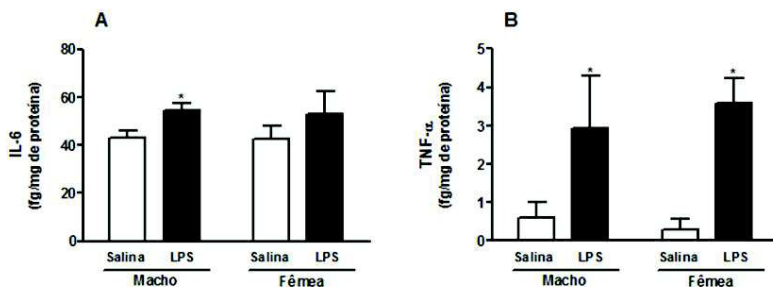


Figura 32. Efeitos da exposição pós-natal ao LPS sobre os níveis de marcadores inflamatórios no estriado. Os animais foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias PN 5 e 10. Os animais controle foram tratados com salina. (A) Níveis de IL-6 e (B) níveis de TNF- α . Os níveis de IL-6 e TNF- α são expressos em fg/mg de proteína. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle tratado com salina, através do teste t de *Student*. $n = 5$

5.2.2 Camundongos expostos posnatalmente ao LPS são mais suscetíveis a uma exposição aos pesticidas PQ e MB na vida adulta?

Os animais tratados com LPS no período PN foram mantidos até os 3 meses de idade e então submetidos a uma exposição aos pesticidas PQ + MB ou à salina na fase adulta. A exposição aos pesticidas nos animais adultos, previamente expostos ao LPS no período pós-natal de desenvolvimento, causou mortalidade de 18,18% ($p = 0,038$) nos animais machos e de 21,74% nas fêmeas ($p = 0,028$), a partir da terceira semana de exposição, em relação ao grupo controle somente tratado com salina em ambas os períodos (Figura 33).

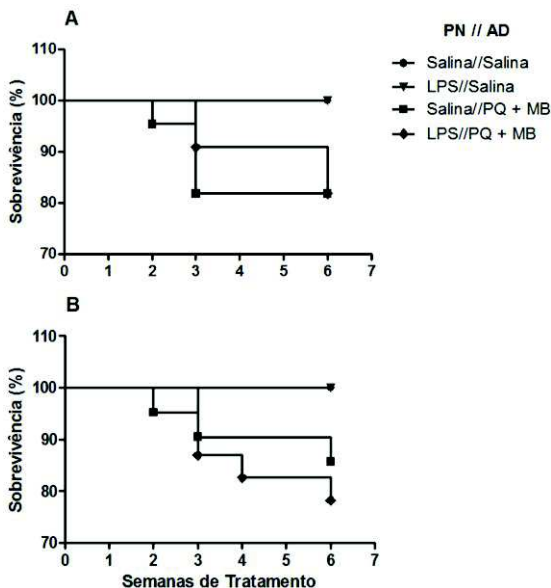


Figura 33. Curva de sobrevivência dos animais tratados posnatalmente com LPS e expostos ao PQ + MB na vida adulta. Os animais foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias PN 5 e 10. Os animais controle receberam salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram expostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. (A) Curva de sobrevivência nos machos e (B) curva de sobrevivência nas fêmeas. Os dados estão representados como porcentagem de sobrevivência. PN: pós-natal, AD: adulto. Machos: n = 21-22; fêmeas: n= 20-24.

A tabela 7 mostra o peso corporal dos animais uma semana após a última administração dos pesticidas. Podemos observar uma redução significativa no peso corporal dos animais tratados com LPS no período pós-natal e expostos à salina ou aos pesticidas na vida adulta em relação ao grupo controle (somente tratado com salina em ambas as exposições) tanto nos camundongos machos como nas fêmeas. A análise de variância de duas vias mostrou um efeito significativo do tratamento pós-natal (efeito do LPS) no peso corporal dos camundongos machos [$F_{(1,75)} = 13,49$; $p = 0,00044$] e fêmeas [$F_{(1,74)} = 9,17$; $p = 0,00033$]. Baseado nisso, é importante ressaltar que o efeito da exposição ao LPS no período pós-natal, sobre o peso corporal, ainda é observado nos animais adultos.

Tabela 7. Peso corporal dos animais expostos posnatalmente ao LPS e reexpostos aos pesticidas na vida adulta.

| Grupos | Peso Corporal (g) | |
|--------------------------|--------------------------|---------------|
| | Machos | Fêmeas |
| <i>PN//AD</i> | | |
| Salina // Salina | 47,23± 1,11 | 40,65± 0,69 |
| LPS // Salina | 43,81± 0,82 * | 37,68± 0,80 * |
| Salina // PQ + MB | 46,39± 0,85 | 39,61± 0,8 |
| LPS // PQ + MB | 42,78± 0,91 ** | 37,89± 0,77 * |

Os dados são representados como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle tratado apenas com salina, através de ANOVA de duas vias, seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. PN: pós-natal, AD: adulto. n= 18-22

A figura 34 mostra os efeitos da exposição ao PQ + MB em camundongos adultos expostos posnatalmente ao LPS no teste do campo aberto. Primeiramente, podemos observar que o efeito pós-natal do LPS em aumentar o número de cruzamentos e levantadas no dia PN 30, não ocorre nos animais adultos (camundongos expostos ao LPS PN e à salina na fase adulta). Porém, os animais que foram tratados previamente com salina ou LPS e posteriormente expostos aos pesticidas apresentaram significativa redução no número de cruzamentos e na atividade exploratória (Figura 35 A-D). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da segunda exposição no número de cruzamentos nos animais machos [$F_{(1, 72)} = 22,54$; $p = 0,000010$] e fêmeas [$F_{(1, 74)} = 9,14$; $p = 0,0034$]. Esses resultados indicam que a exposição pós-natal ao LPS não alterou a vulnerabilidade dos animais a uma segunda exposição ao PQ + MB na vida adulta no teste do campo aberto.

Em relação ao teste do *rotarod*, o déficit motor induzido pela exposição ao LPS pós-natal não foi observado nos animais adultos, indicando que ocorreu uma recuperação no desempenho motor dos animais. Além disso, os camundongos machos tratados com LPS no período PN e expostos aos pesticidas na vida adulta não mostraram nenhuma alteração na coordenação motora avaliada pelo teste do

rotarod (Figura 35 A e B). Por outro lado, nos camundongos fêmeas apenas foram observadas alterações significativas no grupo tratado com salina posnatalmente e exposto aos pesticidas na vida adulta, onde foi evidenciado um aumento significativo no número de quedas ($p<0,015$; Figura 35D).

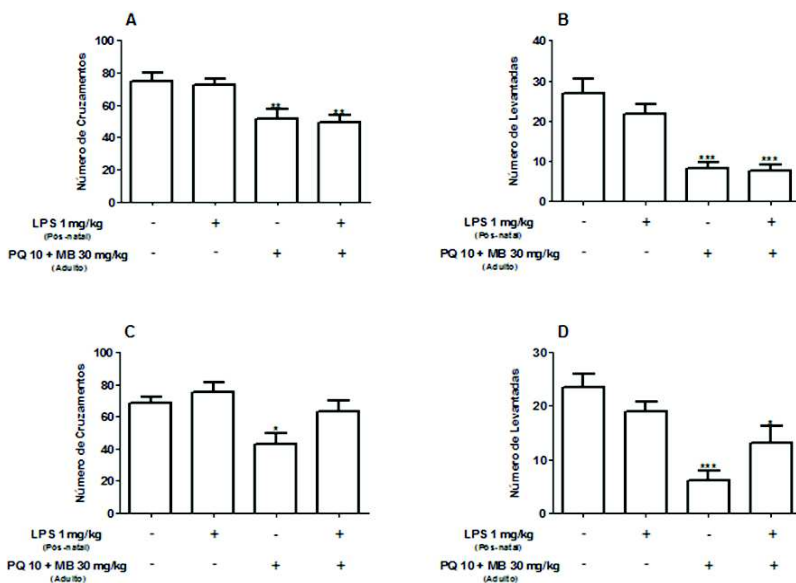


Figura 34. Efeitos da exposição ao PQ + MB na vida adulta em camundongos previamente expostos ao LPS sobre a atividade locomotora e exploratória no campo aberto. Os animais foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias PN 5 e 10. Os animais controle receberam salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram expostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. O teste do campo aberto foi realizado 1 semana após a última exposição nos animais adultos. (A) Número de cruzamentos e (B) número de levantadas nos camundongos machos, (C) número de cruzamentos e (D) número de levantadas nas fêmeas. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ quando comparado ao grupo controle tratado apenas com salina, através de ANOVA de duas vias seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Machos: $n = 16-21$; fêmeas: $n = 18-22$

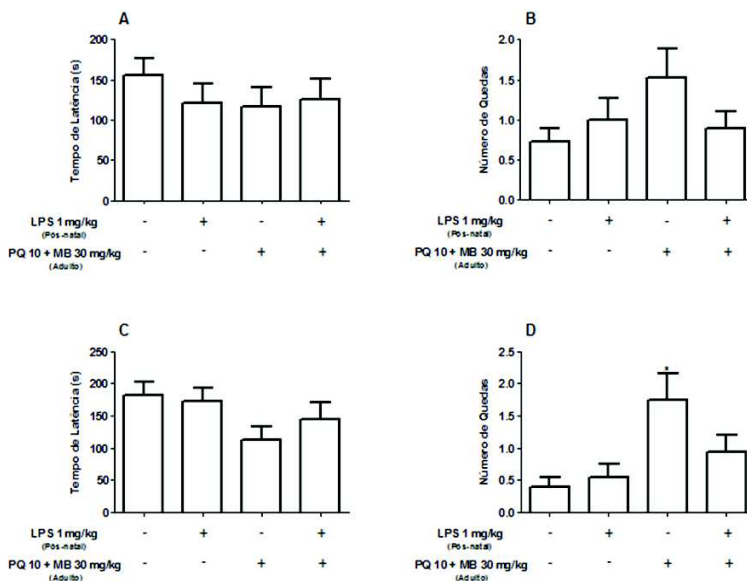


Figura 35. Efeitos da exposição ao PQ + MB na vida adulta em camundongos previamente expostos ao LPS sobre a coordenação motora no *rotarod*. Os animais foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias PN 5 e 10. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram expostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. O teste do *rotarod* foi realizado 1 semana após a última exposição nos animais adultos. (A) Tempo de latência para a primeira queda e (B) número de quedas nos camundongos machos, (C) tempo de latência para a primeira queda e (D) número de quedas nas fêmeas. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle tratado apenas com salina, através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Machos: $n = 17-20$; fêmeas: $n = 15-22$.

Além do *rotarod*, os testes do *beam walking* e do *single pellet* também foram utilizados para avaliar a coordenação motora dos animais. Na figura 36 estão representados os resultados referentes ao *beam walking*. O tempo de latência para atravessar o *beam walking* nos camundongos machos não foi alterado pelos tratamentos. Porém, foi evidenciado um aumento no número de resvaladas nos animais machos tratados com LPS posnatalmente e expostos aos pesticidas na vida adulta ($p < 0,01$; Figura 36 B). Um efeito significativo da segunda

exposição foi observado para o número de resvaladas [$F_{(1, 45)} = 9,76$; $p = 0,0031$]. Por outro lado, nas fêmeas, houve um aumento significativo no tempo de latência ($p < 0,05$; Figura 36C) nos animais tratados com os pesticidas somente na vida adulta, bem como um aumento no número de resvaladas em ambos os grupos expostos ao PQ + MB ($p < 0,001$; Figura 36D). Além disso, um efeito da exposição aos pesticidas foi observado para a latência [$F_{(1, 47)} = 27,51$; $p = 0,00004$] e para o número de resvaladas [$F_{(1, 47)} = 11,42$; $p = 0,0014$]. Assim como para as análises comportamentais acima descritas, no teste do *beam walking*, nenhuma alteração significativa foi observada nos animais adultos previamente expostos ao LPS durante o desenvolvimento em relação ao controle. Enfim, vale ressaltar mais uma vez que, o déficit motor induzido pelo LPS durante o desenvolvimento foi restaurado nos animais adultos. Este resultado, juntamente com os outros testes comportamentais, indica que a performance motora dos animais expostos ao LPS no período pós-natal volta aos valores do controle nos animais adultos.

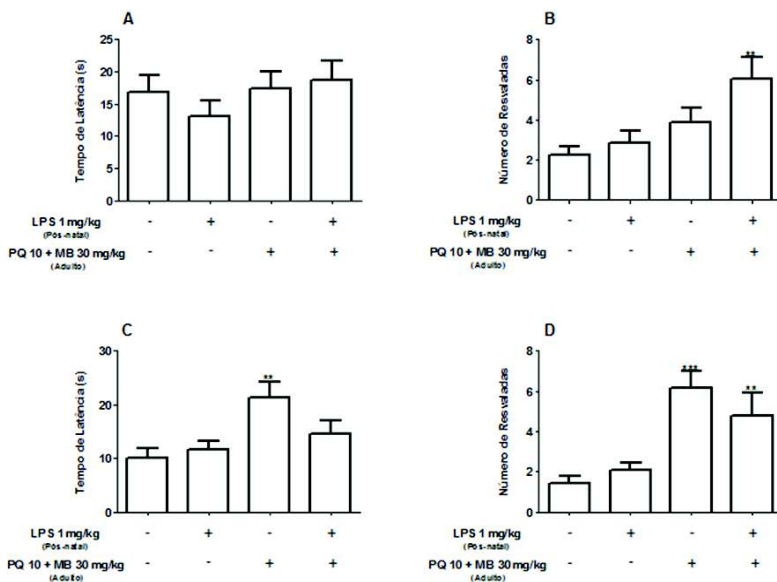


Figura 36. Efeitos da exposição ao PQ + MB na vida adulta em camundongos previamente expostos ao LPS sobre a coordenação motora no *beam walking*. Os animais foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias PN 5 e 10. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram expostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. O teste do *beam walking* foi realizado 1 semana após a última exposição nos animais adultos. (A) Tempo de latência para atravessar o *beam walking* e (B) número de resvaladas nos camundongos machos, (C) tempo de latência para atravessar o *beam walking* e (D) número de resvaladas nas fêmeas. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle através de ANOVA de duas vias seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Machos: $n = 9-13$; fêmeas: $n = 11-16$.

A figura 37 mostra os dados referentes ao teste do *single pellet*. Os camundongos machos tratados com LPS no período pós-natal e posteriormente expostos à salina ou ao PQ + MB quando adultos mostraram uma redução significativa na taxa de sucessos para alcançar a pastilha de ração. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da primeira exposição (LPS pós-natal) [$F_{(1,63)} = 12,96$; $p = 0,000062$] para os animais machos. Já para as fêmeas, não foram observadas alterações significativas.

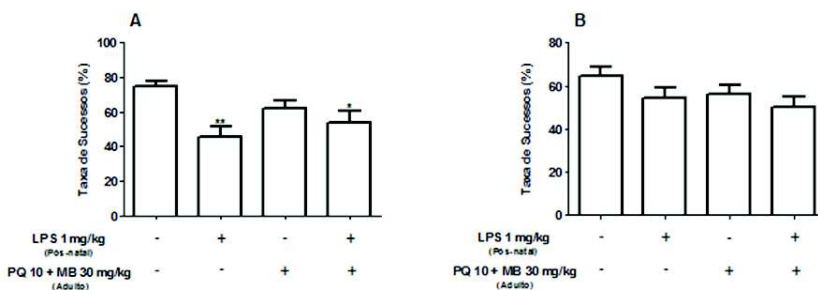


Figura 37. Efeitos da exposição ao PQ + MB na vida adulta em camundongos previamente expostos ao LPS sobre o desempenho motor no *single pellet*. Os animais foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias PN 5 e 10. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram expostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. O teste do *single pellet* foi realizado 1 semana após a última exposição nos animais adultos. (A) Taxa de sucessos nos camundongos machos e (B) taxa de sucessos nas fêmeas. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle tratado apenas com salina, através de ANOVA de duas vias, seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Machos: $n = 15-19$; fêmeas: 16-21.

Assim como para o protocolo de exposição pós-natal aos pesticidas, também foi avaliada a função mitocondrial nos animais previamente tratados com LPS e expostos ao PQ + MB na vida adulta. A exposição ao LPS durante o desenvolvimento seguido da exposição aos pesticidas na fase adulta apresentou uma forte tendência ($p=0,06$) de diminuição na atividade do complexo I nos camundongos machos (Figura 38A). Por outro lado, nenhuma alteração foi observada na atividade do complexo II.

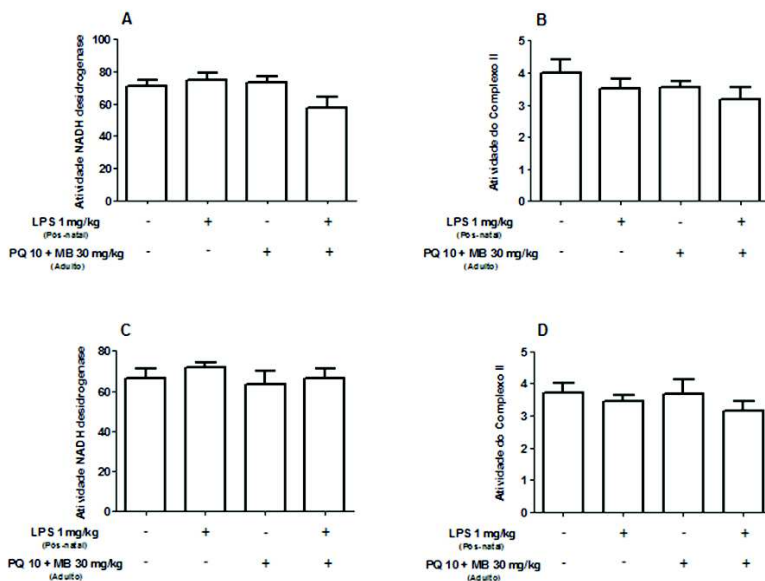


Figura 38. Efeitos da exposição ao PQ + MB na vida adulta em camundongos previamente expostos ao LPS sobre a atividade NADH desidrogenase e do complexo II em camundongos. Os animais foram expostos ao LPS (1 mg/kg, i.p.) nos dias PN 5 e 10. Os animais controle foram tratados com salina. Aos 3 meses de idade os camundongos foram expostos aos pesticidas (PQ 10 mg/kg e MB 30 mg/kg, s.c.) ou à salina 2x/semana durante 6 semanas. (A) Atividades NADH desidrogenase e (B) atividade do complexo II nos camundongos machos, (C) atividades NADH desidrogenase e (D) atividade do complexo II nos camundongos fêmeas. A atividade NADH desidrogenase e do complexo II foram mensuradas no estriado uma semana após a última exposição nos animais adultos e são expressas em nmol/min/mg de proteína. Os dados são representados como média \pm E.P.M. $n = 7$

5.3 CAPÍTULO III - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO PQ + MB EM CULTIVO PRIMÁRIO DE CÉLULAS TRONCO NEURAIS

Na tentativa de compreender os mecanismos de toxicidade dos pesticidas PQ e MB durante o desenvolvimento, o objetivo do capítulo III foi estudar os efeitos da exposição aos pesticidas em cultivos primários de células tronco neurais (NSC). Esse modelo *in vitro* foi escolhido, uma vez que é considerado uma valiosa ferramenta para o estudo dos efeitos de agentes tóxicos sobre o sistema nervoso em desenvolvimento (Tamm, Duckworth *et al.*, 2006; Ceccatelli, Bose *et al.*, 2013). As NSC são células multipotentes localizadas em todas as regiões do cérebro embrionário. Possuem a capacidade de auto-renovação e proliferação, dando origem a células progenitoras neurais que podem ser diferenciadas em neurônios, astrócitos ou oligodendrócitos (Temple, 2001).

Primeiramente realizou-se um estudo de toxicidade com os pesticidas isoladamente, com objetivo de definir uma concentração para ambos na qual houvesse ausência de toxicidade em testes de viabilidade e/ou morte celular, ou seja, buscou-se uma condição de *toxicidade silenciosa*. Como pode-se observar na figura 39, as exposições aos pesticidas PQ e MB na concentração de 10 μ M durante 24 horas causaram uma diminuição de aproximadamente 30% na viabilidade celular avaliada através do ensaio de redução do MTT ($p < 0,001$; Figura 39A e B). Além disso, o PQ na concentração de 100 μ M, que diminuiu a redução do MTT em torno de 75%, foi capaz de induzir um aumento de 54 % no número de células apoptóticas, bem como aumentou a porcentagem de morte celular (42%) através do ensaio do IP ($p < 0,05$; Figura 39 C e E). Já a concentração de 10 μ M de MB induziu um aumento de 23 e 30 % no número de células apoptóticas e na porcentagem de morte celular por IP, respectivamente ($p < 0,05$; Figura 39D e F).

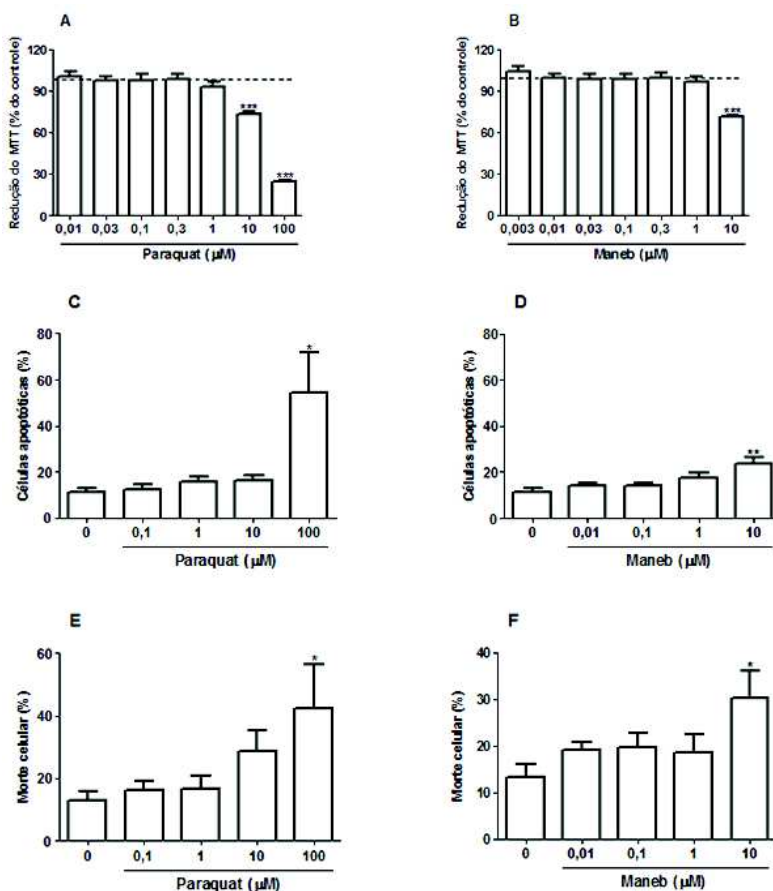


Figura 39: Efeitos da exposição aos pesticidas sobre parâmetros de toxicidade em células tronco neurais. As células foram expostas ao PQ (0,01 - 100 μM) e ao MB (0,003 - 10 μM) durante 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método da redução do MTT após a exposição ao PQ (A) ou ao MB (B) e expressos como porcentagem do controle (representado pela linha pontilhada). A apoptose foi avaliada em células expostas ao PQ (C) e ao MB (D) pela marcação dos núcleos com Hoechst 33342 e analisada por microscopia de fluorescência, e os resultados expressos em porcentagem de células apoptóticas. A incorporação do iodeto de propídio (IP), após a exposição ao PQ (E) e ao MB (F) foi analisada sob microscópio de fluorescência e o resultado expresso em porcentagem de morte celular em relação ao controle 100 % de morte (células tratadas com triton X-100 a 2 % por 5 minutos). Os dados são representados como média ± E.P.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle através de ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. $n = 5-8$

Baseado nesses resultados, a concentração de 1 μM , que não induziu nenhuma alteração nos ensaios acima descritos, foi selecionada para os estudos posteriores, nos quais os pesticidas foram utilizados em combinação. A figura 40 mostra que a associação de PQ e MB 1 μM não alterou os parâmetros de toxicidade avaliados. Entretanto, houve uma redução significativa no número total de células, determinado pela coloração de azul de trypan, quando os pesticidas foram combinados ($p < 0,05$; Figura 40C).

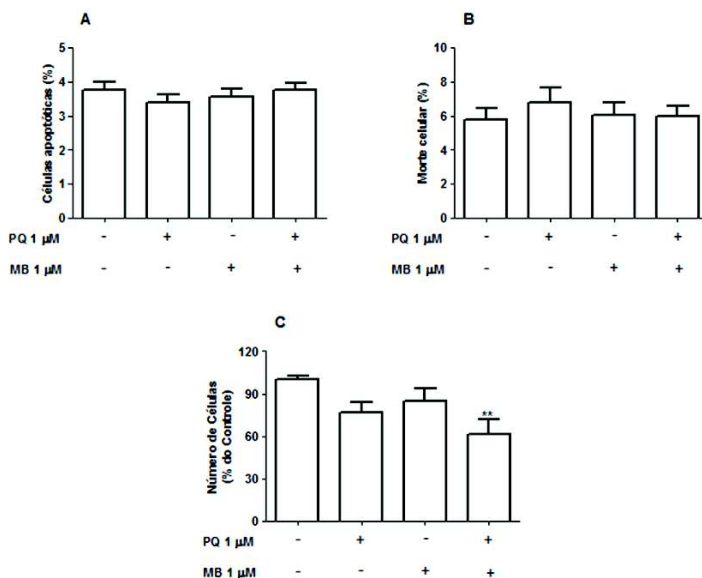


Figura 40: Efeitos da exposição ao PQ+MB sobre parâmetros de toxicidade e número total de células. As células foram expostas ao PQ (1 μM) e/ou ao MB (1 μM) durante 24 horas. A morfologia celular foi avaliada através da marcação dos núcleos com Hoechst 33342 e os resultados foram expressos em porcentagem de células apoptóticas (A). A incorporação do iodeto de propídio foi analisada por microscopia de fluorescência e os resultados expressos em porcentagem de morte celular em relação a um controle 100 % de morte (células tratadas com triton X-100 a 2 % por 5 minutos) (B). A determinação do número total de células (C) foi realizada através da contagem das células coradas com azul de trypan a 4 % e os resultados expressos em porcentagem do controle. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle através de ANOVA de duas vias seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. $n = 4-5$

Este resultado foi confirmado por uma diminuição significativa na porcentagem de células positivas para o KI-67 nas células expostas a ambos os pesticidas em associação ($p < 0,001$; Figura 41A e C). Entretanto, foi também observada uma redução para KI-67 nas células tratadas apenas com o PQ ou MB. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do PQ [$F_{(1,12)} = 130,59$; $p < 0,001$] e do MB [$F_{(1,12)} = 32,54$; $p = 0,000098$] na porcentagem de células positivas para KI-67.

O KI-67 é um marcador de células em proliferação, sendo expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto no G0 (Scholzen e Gerdes, 2000). Dessa forma, a redução observada indica uma redução na proliferação celular. Além do KI-67 foi também avaliada a marcação para nestina, uma proteína que é somente expressa em células progenitoras. Como representado na figura 41B e D, não houve diferença significativa no número de células positivas para nestina. Esse resultado indica que as células tronco neurais não perderam suas características de células proliferativas continuando num estágio indiferenciado, porém com uma diminuição significativa na proliferação celular após a exposição aos pesticidas.

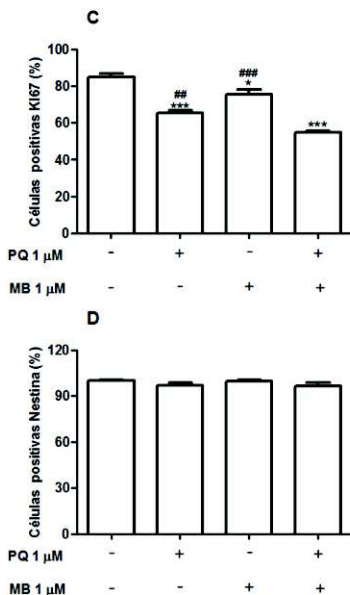
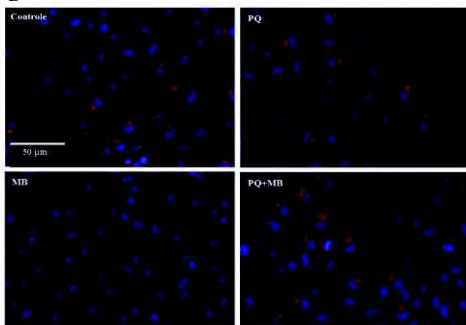
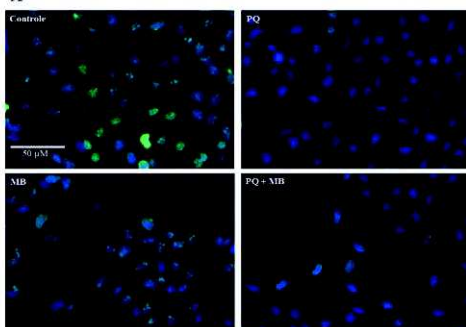


Figura 41: A exposição ao PQ + MB diminui a proliferação das células tronco neurais. As células foram expostas ao PQ (1 μ M) e/ou ao MB (1 μ M) durante 24 horas. As marcações para KI-67 (A e C) e nestina (B e D) foram realizadas através de análise imunocitoquímica. Os núcleos foram corados com Hoechst 33342 por 5 minutos e as imagens capturadas utilizando microscópio de fluorescência. Figura representativa para KI-67 (A) e nestina (B). A quantificação foi realizada através da contagem das células positivas para KI-67 (C) e nestina (D) e os resultados expressos em porcentagem de células positivas em relação ao número de células total. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle. ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo PQ+MB através de ANOVA de duas vias seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Escala = 50 μ m. $n = 4$

A proliferação celular está relacionada com o funcionamento do ciclo celular. O ciclo celular é dividido basicamente em 4 fases (G1, S, G2, M) e a fase G0 onde não ocorre divisão celular. A progressão através do ciclo celular é dependente de uma série de eventos sequenciais regulados por meio de fatores que agem de maneira ordenada para garantir que cada evento do ciclo ocorra no tempo correto e de uma maneira eficiente. Essa regulação ocorre através da ação de

ciclinas, proteínas cinases dependentes de ciclinas (Cdk), proteínas inibidoras de Cdk, além da ação de outras proteínas e fatores de transcrição (Satyanarayana e Kaldis, 2009; Kawauchi, Shikanai *et al.*, 2013). A figura 42 esquematiza resumidamente alguns dos principais pontos de regulação do ciclo celular, com ênfase nos pontos os quais foram estudados no presente trabalho.

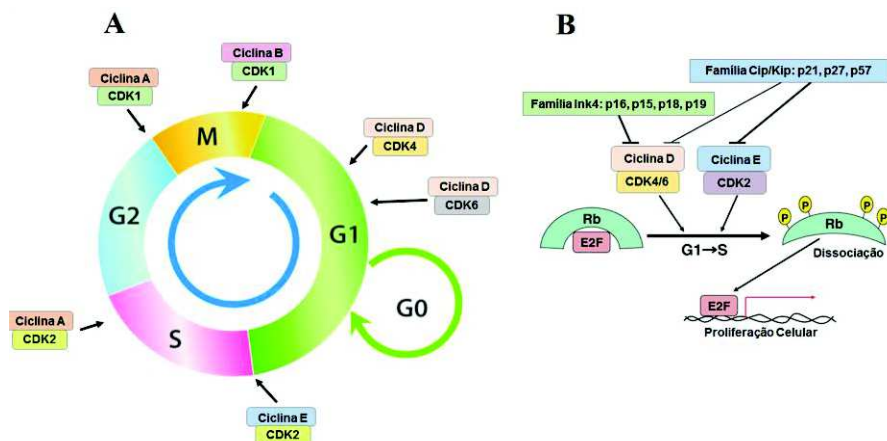


Figura 42. Representação esquemática do ciclo celular e a regulação da transição das fases G1/S. Fases do ciclo celular (A). Em eucariotos, o ciclo celular corresponde a uma sequência de eventos dividido em 4 fases distintas: fase G1, é a fase mais longa do ciclo sendo o período onde ocorre o crescimento celular, fase S, período de síntese de DNA, fase G2, onde as células estão se preparando para se dividir e entrar na fase M e a fase M onde ocorre a mitose e divisão celular. As fases G1, S e G2 são conhecidas como interfase. A fase G0 corresponde a uma fase quiescente, onde não ocorre divisão celular (neurônios após a diferenciação). A progressão do ciclo celular é dirigida pela ação de proteínas conhecidas como cinase dependentes de ciclinas (Cdks) e a formação de complexos com diferentes ciclinas (ciclina-Cdk) dependendo da fase do ciclo celular. Mecanismos moleculares de transição da fase G1 para a fase S (B). A transição G1/S depende da atividade dos complexos ciclina D-Cdk4/6 e ciclina E-Cdk2. Esses complexos fosforilam a proteína pRb dissociando o fator de transcrição E2F. Em células progenitoras, E2F promove a transição G1/S. A atividade dos complexos ciclina D-Cdk é inibida pelos inibidores de Cdk representados pela família Ink4 (p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} e p19^{Ink4d}) e Cip/Kip (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}). A figura B foi adaptada de Kawauchi e colaboradores, 2013.

Como foi constatado uma redução na proliferação das células tronco neurais, que, por sua vez, pode estar relacionada a uma alteração no funcionamento do ciclo celular, a expressão gênica de algumas proteínas envolvidas no ciclo celular foi investigada. Primeiramente, foi avaliada a expressão gênica das ciclinas D1 e D2 (*Ccnd2*), importantes para promover a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. De maneira interessante, a expressão gênica da ciclina D1 e D2 foi significativamente reduzida nas células expostas ao PQ + MB ($p < 0,05$; Figura 43). Foi observado um efeito significativo tanto do PQ [$F_{(1,12)} = 5,04$; $p = 0,044$] como do MB [$F_{(1,12)} = 5,62$; $p = 0,035$] sobre a expressão da ciclina D2, bem como um efeito do PQ na ciclina D1 [$F_{(1,12)} = 4,69$; $p = 0,050$].

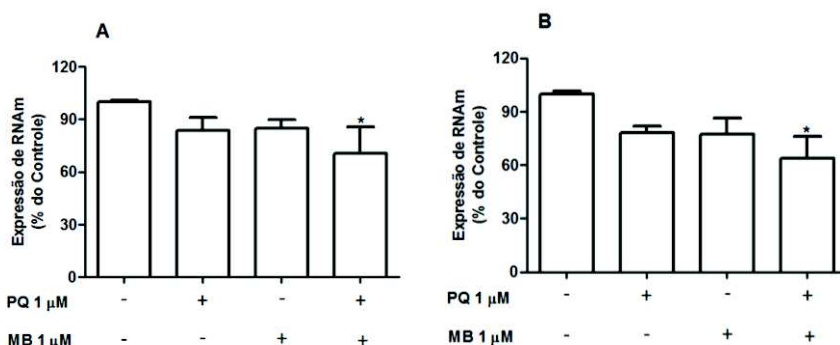


Figura 43. A exposição ao PQ + MB diminui a expressão do RNAm das ciclinas D1 e D2. As células foram expostas ao PQ (1 μ M) e/ou ao MB (1 μ M) durante 24 horas. A expressão do mRNA da ciclina D1 (A) e D2 (B) foi determinada através de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR). Os níveis de expressão do RNAm foram normalizados em relação ao gene *housekeeping* e os resultados finais expressos em porcentagem do controle. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle através de ANOVA de duas vias seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. $n = 4$

As ciclinas D normalmente se associam às proteínas Cdk4 e Cdk6, formando complexos. Os complexos ciclinaD/Cdk4/6 são responsáveis pela fosforilação da família de proteínas derivadas do retinoblastoma (pRb). As proteínas pRb sequestram fatores que funcionam para a progressão do ciclo celular, como a família de proteínas E2F. As proteínas E2F são fatores de transcrição que quando ligados pelas proteínas pRb, no seu estado hipofosforilado, impedem

que o ciclo prossiga da fase G1 para a fase S. A fosforilação de pRb pelos complexos ciclinaD/Cdk4/6 faz com que E2F seja liberado e, dessa forma, outros fatores de transcrição são ativados para a continuidade do ciclo (Satyanarayana e Kaldis, 2009; Kawauchi, Shikanai *et al.*, 2013). A exposição ao PQ, ao MB ou ao PQ + MB foi capaz de aumentar significativamente a expressão gênica da proteína pRb1, onde foram observados efeitos tanto do PQ [$F_{(1,16)} = 13,20$; $p = 0,022$] como do MB [$F_{(1,16)} = 8,57$; $p = 0,0098$] (Figura 44A). Por outro lado, a expressão da proteína E2F1 não foi alterada em nenhuma das condições estudadas.

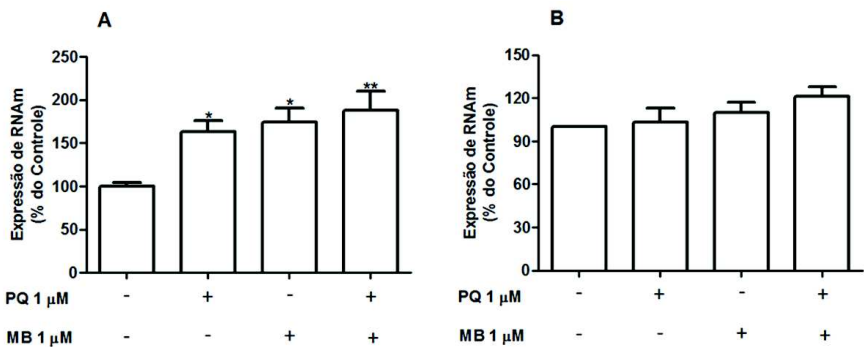


Figura 44. Efeitos da exposição ao PQ + MB sobre a expressão do RNAm das proteínas pRb1 e E2F1. As células foram expostas ao PQ (1 µM) e/ou ao MB (1 µM) durante 24 horas. A expressão do mRNA para a proteína pRb1 (A) e E2F1 (B) foi determinada através de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR). Os níveis de expressão do RNAm foram normalizados em relação ao gene *housekeeping* e os resultados finais expressos em porcentagem do controle. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle através de ANOVA de duas vias seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. $n = 5$

Por fim, avaliamos também a expressão gênica de alguns inibidores de Cdk's como os inibidores p16^{Ink4a} (Cdkn2a), p19^{Ink4d} (Cdkn2d), p21^{Cip1} (Cdkn1a) e p57^{Kip2} (Cdkn1c). Não foram encontradas alterações significativas na expressão gênica dos inibidores p16, p21 e p57. Entretanto, constatamos que a expressão do RNAm para o inibidor p19 foi aumentado nas três condições experimentais [$F_{(1,16)} = 14,42$; $p = 0,0015$] para o PQ e [$F_{(1,16)} = 19,45$; $p = 0,00043$] para o MB (Figura 45

D), indicando que a redução na proliferação celular, avaliada pelo ensaio do KI-67, pode estar relacionada a uma super expressão do inibidor p19, além da diminuição da expressão das ciclinas D e aumento na expressão de pRb1.

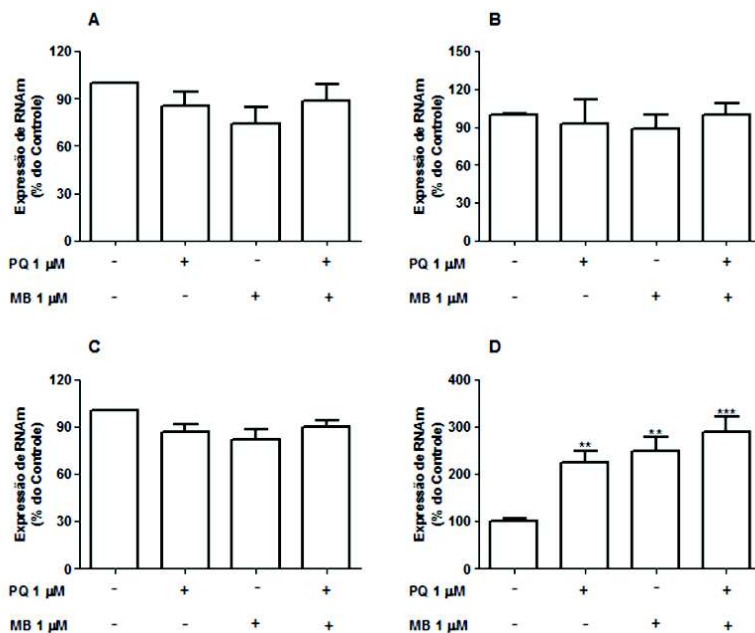


Figura 45. Efeitos da exposição ao PQ + MB sobre a expressão do RNAm de inibidores de Cdks. As células foram expostas ao PQ (1 μ M) e/ou ao MB (1 μ M) durante 24 horas. A expressão do mRNA para os inibidores de Cdks p21^{Cip1} (A), p57^{Kip2} (B), p16^{Ink4a} (C) e p19^{Ink4d} (D) foi determinada através de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR). Os níveis de expressão do RNAm foram normalizados em relação ao gene *housekeeping* e os resultados finais expressos em porcentagem do controle. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle através de ANOVA de duas vias seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. $n = 4 - 5$

Tendo em vista o envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de toxicidade dos pesticidas, os níveis de ER foram mensurados 24 horas após a incubação com PQ e MB. A exposição ao PQ ou ao PQ + MB aumentou os níveis de ER ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente; Figura 46A). Apesar do aumento nas ER, a expressão

gênica das enzimas antioxidantes GPx1, catalase 1 e SOD 1 não foram alteradas significativamente após 24 horas de exposição (Figura 46 B-D). Entretanto, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da exposição ao PQ na expressão da GPx1 [$F_{(1,16)} = 14,59$; $p = 0,0015$] e da SOD 1 [$F_{(1,16)} = 8,49$; $p = 0,010$]. Esses dados confirmam o efeito primário do PQ em aumentar a geração de espécies reativas.

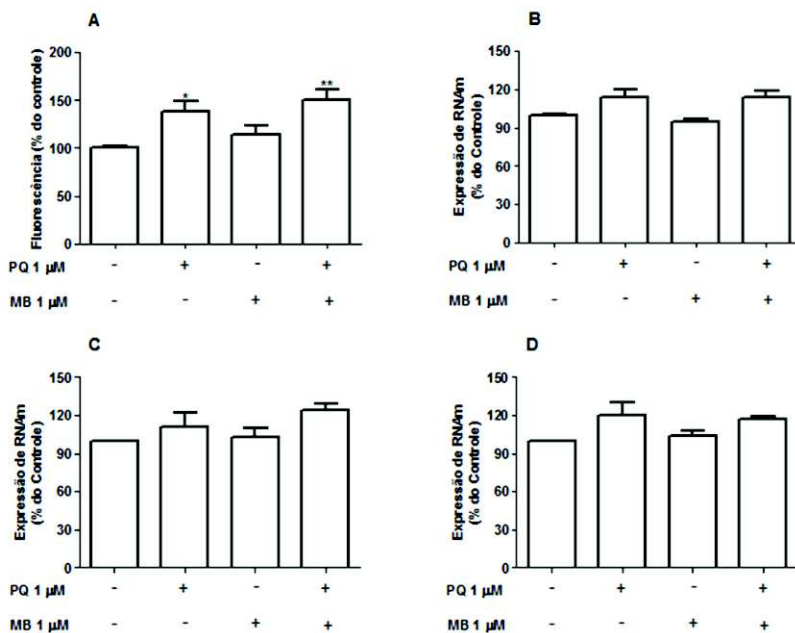


Figura 46. Efeitos da exposição ao PQ + MB sobre parâmetros de estresse oxidativo em células tronco neurais. As células foram expostas ao PQ (1 μ M) e/ou ao MB (1 μ M) durante 24 horas. A geração de espécies reativas (A) foi determinada através da sonda fluorescente Carboxi-H₂DCFDA e os resultados foram expressos em porcentagem do controle. A expressão do mRNA para as enzimas antioxidantes GPx1 (B), catalase 1 (C) e SOD1 (D) foi determinada através de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR). Os níveis de expressão do RNAm foram normalizados em relação ao gene *housekeeping* e os resultados finais expressos em porcentagem do controle. Os dados são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle através de ANOVA de duas vias seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. $n = 4 - 5$

Além dos efeitos do PQ e MB sobre na proliferação das células tronco neurais, investigamos também uma possível alteração na capacidade de diferenciação dessas células em neurônios. Para estudar tal efeito, o fator de crescimento foi removido do meio para induzir diferenciação espontânea e ao mesmo tempo, as células foram expostas aos pesticidas durante 24 horas. Após 6 dias de diferenciação, nenhuma diferença foi observada na expressão gênica de Tuj 1, um marcador de neurônios jovens (Figura 47A). Além disso, foi determinada a expressão gênica da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um marcador para células gliais (Figura 47B). Da mesma forma, a expressão de GFAP não foi alterada pelos tratamentos, indicando que apesar das alterações induzidas pelos pesticidas durante a fase proliferativa, as células parecem estarem aptas a se diferenciarem de maneira similar às células controle.

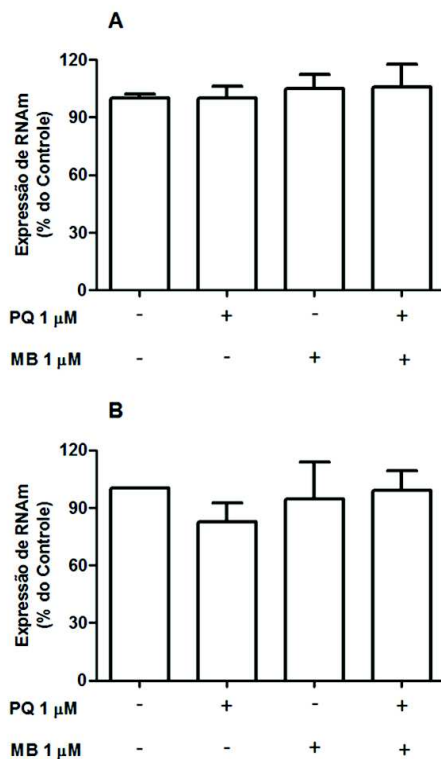


Figura 47. Efeitos da exposição ao PQ + MB em células tronco neurais sobre marcadores de diferenciação. As células foram expostas ao PQ (1 μ M) e/ou ao MB (1 μ M) durante 24 horas e submetidas ao protocolo de diferenciação através da remoção do fator de crescimento do meio. Após 6 dias de diferenciação, a expressão do mRNA para o marcador de neurônios jovens Tuj1 (A) e para o marcador de células gliais GFAP (B) foi determinada através de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR). Os níveis de expressão do RNAm foram normalizados em relação ao gene *housekeeping* e os resultados finais expressos em porcentagem do controle. Os dados são representados como média \pm E.P.M. n= 4

6. DISCUSSÃO

O período de desenvolvimento é altamente sensível a fatores ambientais, tais como nutrientes, toxicantes, infecções, dentre outros. Esses fatores podem contribuir para o desenvolvimento de doenças na vida adulta. Muitas das doenças com prevalência acima dos 40 anos parecem estar, pelo menos em parte, relacionadas a fatores do desenvolvimento, tais como a exposição a agentes tóxicos e infecções (Barouki, Gluckman *et al.*, 2012). Em relação à DP, como mencionado anteriormente, sabe-se que essa doença pode estar relacionada não apenas a fatores ambientais da fase adulta, mas fatores ambientais durante o desenvolvimento do SNC podem contribuir para o surgimento de sintomas da DP.

Durante o envelhecimento normal, os neurônios dopaminérgicos comumente vão se degenerando com consequente diminuição na sua função. Porém, insultos tóxicos durante a vida adulta podem acelerar essa degeneração e perda de função, culminando com o aparecimento de sintomas de Parkinson mais cedo. Entretanto, é postulado atualmente que fatores da vida perinatal (como a exposição a pesticidas ou infecções) que causam uma alteração na função dos neurônios dopaminérgicos ou até mesmo morte neuronal, também podem acelerar esse processo. Ademais, essa perda de função dos neurônios dopaminérgicos ocasionada por um insulto durante o desenvolvimento pode ser potencializada quando o sistema nervoso é exposto a novos agentes tóxicos na fase adulta. Este é um modelo hipotético para a neurotoxicidade dopaminérgica induzida por toxicantes ambientais proposto previamente na literatura baseado em estudos com roedores (Thiruchelvam, Richfield *et al.*, 2002; Cory-Slechta, Thiruchelvam *et al.*, 2005).

Porém, até o presente momento, não se tem conhecimento dos mecanismos envolvidos na toxicidade dos pesticidas e do processo inflamatório no sistema nervoso em desenvolvimento. De fato, não se sabe quais as alterações que esses agentes causam no sistema nervoso em desenvolvimento que culminam com um estado de *toxicidade silenciosa* (ausência de toxicidade aparente, mas que pode ser evidenciada mediante novo insulto). Assim, o primeiro objetivo geral do trabalho foi baseado em duas principais perguntas. A primeira delas foi: quais são as alterações desencadeadas pela exposição aos pesticidas PQ + MB durante o desenvolvimento? Essas alterações podem alterar a vulnerabilidade do sistema dopaminérgico a insultos ambientais subsequentes?

Para responder a estas perguntas, primeiramente investigamos os efeitos da exposição pós-natal ao PQ + MB em camundongos no dia PN 30. Os animais expostos aos pesticidas não demonstraram nenhuma alteração comportamental relacionado ao sistema motor, nem perda de peso corporal, sugerindo ausência de toxicidade aparente. Além disso, a exposição aos pesticidas não alterou parâmetros de estresse oxidativo e nem marcadores inflamatórios no estriado. Porém, quando a função mitocondrial foi analisada, observamos diminuição na atividade dos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial nos animais machos. Esse resultado sugere que, apesar da ausência de toxicidade perinatal aparente após a exposição aos pesticidas, eventos tóxicos podem estar ocorrendo no sistema nervoso, tais como a alteração na homeostase mitocondrial no estriado.

Sabe-se que a função mitocondrial é extremamente importante no desenvolvimento neuronal. As mitocôndrias possuem um papel essencial não apenas na produção de ATP e na morte celular, mas funções como fusão e fissão, biogênese e mitofagia são processos cruciais para o desenvolvimento neuronal. Além disso, as mitocôndrias regulam a resposta imune inata que possui um papel importante no desenvolvimento cerebral, na susceptibilidade e na resposta do sistema nervoso ao dano neuronal (Hagberg, Mallard *et al.*, 2014). Em camundongos, o metabolismo oxidativo e a função mitocondrial diferem entre animais durante o período perinatal e na vida adulta. Por exemplo, a utilização metabólica de glicose e oxigênio é substancialmente maior (de 3 a 7 vezes) durante as primeiras 2-3 semanas de desenvolvimento pós-natal em relação ao cérebro adulto (Nehlig, De Vasconcelos *et al.*, 1988). Neste período de desenvolvimento, ocorre um aumento na transmissão sináptica e uma alta demanda energética é necessária para manter a homeostase iônica (Erecinska, Cherian *et al.*, 2004). Além disso, nesta fase, o número de mitocôndrias por células quadruplica, principalmente entre os dias PN 1-21, o que é acompanhado por um aumento no conteúdo de proteínas e enzimas mitocondriais implicadas na produção de energia (Dahl e Samson, 1959; Land, Booth *et al.*, 1977; Erecinska, Cherian *et al.*, 2004). Esse processo é essencial para a diferenciação, maturação e sinaptogênese neuronal, sendo que insultos tóxicos que possam interferir com esses eventos prejudicam o processo de maturação neuronal normal (Hagberg, Mallard *et al.*, 2014). Em nosso estudo, a exposição aos pesticidas durante o período PN causou uma inibição na atividade dos complexos I e II e este efeito pode ter consequências deletérias no desenvolvimento. De fato, esse evento pode estar relacionado à diminuição de neurônios dopaminérgicos observada

na SNpc. A exposição PN aos pesticidas foi capaz de reduzir significativamente os neurônios TH⁺ e DAT⁺ na SNcp, bem como a imunomarcagem para TH e DAT no estriado dos camundongos machos.

Considerando os resultados obtidos, perguntou-se: Será que essas alterações observadas na função mitocondrial e nos marcadores dopaminérgicos na SNpc e no estriado, após a exposição PN ao PQ + MB, poderiam ser responsáveis por alterar a suscetibilidade a esses toxicantes na vida adulta? Estarão essas alterações relacionadas ao mecanismo de *toxicidade silenciosa*? Em busca de respostas, camundongos previamente expostos ao PQ + MB durante o desenvolvimento foram reexpostos aos pesticidas na vida adulta. Os resultados mostram que houve déficit comportamental e diminuição nos neurônios TH⁺ e DAT⁺ na SNpc nos animais que receberam as duas exposições aos pesticidas, especialmente nos camundongos machos. Esse déficit comportamental foi evidenciado em testes que avaliam principalmente a função motora relacionada à coordenação e equilíbrio, como por exemplo, o *rotarod*, *beam walking* e *single pellet*.

O *single pellet* é um teste que avalia um comportamento motor fino, que envolve coordenação motora de membros superiores. Um dado recente da literatura mostra que a disfunção no teste do *single pellet* foi correlacionada com a depleção de dopamina no estriado de ratos após lesão com 6-OHDA (Plowman, Maling *et al.*, 2013). Além disso, Pioli e colaboradores sugeriram que lesões na SNpc induzidas por 6-OHDA com diminuição de neurônios TH⁺ nesta estrutura, bem como redução dos níveis de dopamina no estriado, causam déficits no controle motor fino de ratos, avaliado através de outros testes motores semelhantes ao *single pellet* (Pioli, Meissner *et al.*, 2008). Estudos mostram que o sistema nigroestriatal regula o comportamento de membros anteriores por modular a atividade de neurônios no estriado dorsolateral, que são críticos para o movimento dos membros (Pisa, 1988). Além disso, o *single pellet* também avalia habilidade de aprendizagem motora, que mede a capacidade dos animais de aprender uma nova tarefa seguido de treinamento e de reter a memória para execução desta função por um período relativamente longo, sendo também dependente do estriado, especialmente o estriado dorsal (Packard e Knowlton, 2002).

O *beam walking* também pode ser usado para mensurar coordenação motora fina e equilíbrio motor e pode ser considerado mais sensível que o *rotarod*, que também é utilizado para avaliar coordenação motora em diferentes modelos experimentais (Stanley, Lincoln *et al.*, 2005; Quinn, Perren *et al.*, 2007). Em ratos, o desempenho motor no *rotarod* foi correlacionada a danos na SNpc (Monville, Torres *et al.*,

2006). No presente trabalho houve déficit motor nestes três testes nos camundongos machos expostos posnatalmente e reexpostos aos pesticidas na vida adulta. Além disso, neste mesmo grupo, houve redução nos neurônios dopaminérgicos na SNpc, enquanto no estriado as marcações para TH e DAT não foram modificadas. Baseado nesses dados, pode-se inferir que a alteração na performance dos animais nos testes motores pode estar relacionada a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc, uma vez que não foram constatadas alterações na expressão da TH e DAT no estriado e nem os níveis de dopamina foram modificados. Esses resultados sugerem um possível aumento na vulnerabilidade dos camundongos machos, previamente expostos aos pesticidas, a uma segunda exposição na vida adulta, uma vez que as alterações foram observadas apenas no grupo exposto ao PQ + MB em ambos os períodos.

Por outro lado, nas fêmeas, os resultados foram diferentes. No teste do *rotarod* foi observado déficit motor apenas no grupo exposto aos pesticidas na fase adulta. Já no *beam walking*, tanto o grupo exposto aos pesticidas somente na vida adulta como o grupo que recebeu as duas exposições (PN + adulto) mostraram alterações comportamentais. E no teste do *single pellet*, somente foram observadas alterações no grupo tratado com PQ + MB posnatalmente e reexposto na vida adulta. Porém a ANOVA de duas vias, indicou um efeito da segunda exposição, o que pode sugerir que nas fêmeas a exposição pós-natal aos pesticidas parece não conferir um aumento na vulnerabilidade ao segundo desafio. Além disso, em relação aos marcadores dopaminérgicos na SNpc e no estriado, nenhuma alteração foi evidenciada. E, quando avaliado um possível efeito da variável sexo, vimos que tanto no teste do *single pellet* quanto para os neurônios TH⁺ houve um efeito significativo do sexo, sugerindo uma diferença entre macho e fêmea, onde os machos possivelmente apresentam maior vulnerabilidade. Anteriormente, Cory-Slechta e colaboradores mostraram uma proteção em camundongos fêmeas expostas posnatalmente ao PQ + MB e reexpostos na vida adulta quando comparadas aos machos. Foi observado uma menor alteração nos níveis estriatais de dopamina, bem como no número de neurônios TH⁺ na SNpc das fêmeas, que foi atribuído a eventos associados à maturação do sistema reprodutivo nas fêmeas (Cory-Slechta, Thiruchelvam *et al.*, 2005).

Diversas doenças neurológicas apresentam uma diferença na incidência, na severidade e na progressão entre os sexos. Por exemplo, o autismo é mais comum no sexo masculino, enquanto as mulheres possuem uma predisposição maior para a depressão e ansiedade

(Mandy, Chilvers *et al.*, 2012; Altemus, Sarvaiya *et al.*, 2014). Além disso, a doença de Alzheimer também é mais comum em mulheres (Alzheimer's, 2014), por outro lado o Parkinson acomete em maior porcentagem indivíduos do sexo masculino (Baldereschi, Di Carlo *et al.*, 2000; Taylor, Cook *et al.*, 2007; Gillies, Pienaar *et al.*, 2014). Estudos epidemiológicos sugerem que os hormônios sexuais contribuem para a diferença na incidência da DP (Mcarthur e Gillies, 2011), além de exercer um importante papel no desenvolvimento e na severidade dos sintomas motores e não motores da doença (Solla, Cannas *et al.*, 2012; Heller, Dogan *et al.*, 2014).

Entretanto, essas diferenças parecem existir mais cedo, em indivíduos jovens, antes da idade reprodutiva. Por exemplo, a formação da micróglia ocorre no início do desenvolvimento, por volta do dia embrionário 9,5 (E9,5), sendo que no E18 nenhuma diferença entre os sexos foi observada no número de células da micróglia encontrada em cérebro de ratos (Schwarz, Sholar *et al.*, 2012). Entretanto, diferenças tanto no número como na morfologia das células da micróglia foram observadas posnatalmente, onde ratos machos apresentaram maior número de células da micróglia do que as fêmeas no dia PN 4 no córtex parietal e em regiões do hipocampo e amígdala. Já no dia PN 30 e 60, foi observado o contrário, ratos fêmeas apresentaram maior número de células microgliais do que os machos em sub-regiões do hipocampo, na amígdala e no córtex parietal (Schwarz, Sholar *et al.*, 2012). Essa diferença na micróglia em machos e fêmeas é interessante podendo estar relacionada a uma susceptibilidade divergente entre os sexos dependendo do estágio de desenvolvimento (Hanamsagar e Bilbo, 2015). Por exemplo, durante os estágios iniciais do desenvolvimento, quando os machos apresentam um predomínio de micróglia amebóide, um insulto poderia alterar a função microglial (e eventualmente alterar a função neuronal) devido a uma super ativação dessas células. Pouco se sabe sobre esses mecanismos, entretanto, é importante reconhecer que diferenças entre os sexos no sistema imunológico do SNC existem e podem contribuir para o aumento da suscetibilidade para desenvolver doenças neurológicas na fase adulta tardia.

No protocolo de exposição PN aos pesticidas, não foram vistos aumentos significativos nos níveis de interleucinas inflamatórias no estriado no dia PN 30, entretanto os marcadores dopaminérgicos foram alterados no estriado e na substância negra.

A redução dos neurônios TH⁺ na SNpc pode ser atribuída à degeneração e morte desses neurônios, uma vez que nos animais adultos, essa redução ainda se encontrava presente, e foi potencializada

após uma segunda exposição. Dessa forma, a redução nos neurônios TH⁺ após a exposição PN possivelmente está relacionada ao mecanismo de *toxicidade silenciosa*, uma vez que não houve déficits comportamentais, perda de peso ou qualquer outra alteração no desenvolvimento dos camundongos após a exposição PN.

Já no estriado foi diferente. Após a exposição PN houve uma redução na marcação para TH e DAT, mas que foi recuperada nos animais adultos, indicando uma alteração apenas na expressão dessas proteínas. Além disso, o estriado não parece ser mais suscetível a uma segunda exposição ao PQ+MB, pois nenhuma alteração foi observada. Dados sugerem que o PQ induz degeneração principalmente na substância negra. No modelo do MPTP, por exemplo, tanto os terminais dopaminérgicos estriatais quanto os corpos celulares da SN são afetados (Aguar, Lopes *et al.*, 2015; He, Uchida *et al.*, 2015). Já no modelo do PQ, no entanto, a SN parece ser a região especialmente afetada (McCormack, Thiruchelvam *et al.*, 2002).

Rappold e colaboradores sugeriram um possível mecanismo para essa diferença entre as estruturas cerebrais. Esses autores mostraram que o PQ⁺ é substrato tanto para o DAT como para os transportadores Oct3 (Rappold, Cui *et al.*, 2011). A imunoreatividade para Oct3 é maior no estriado em relação a substância negra, sendo esses transportadores expressos principalmente em astrócitos e em neurônios espinhais médios gabaérgicos (Gasser, Orchinik *et al.*, 2009). Dessa forma, é postulado que os menores níveis de Oct3 aliado à alta densidade de micrógliia na substância negra (importante na redução do PQ²⁺ para PQ⁺), faria com que o PQ⁺ ficasse disponível preferencialmente para o DAT nos neurônios dopaminérgicos, contribuindo para a maior sensibilidade desta região em relação ao estriado. Esta hipótese é sustentada por dados que mostram que camundongos *knockout* para Oct3 (Oct3^{-/-}) apresentam dano dopaminérgico no estriado após administração de PQ, o que não é observado nos animais selvagens (Rappold, Cui *et al.*, 2011). Por outro lado, Thiruchelvam e colaboradores mostraram que a diminuição nos níveis de TH no estriado ocorre de maneira progressiva e é dependente da idade, visto que reduções significativas foram evidenciadas 3 meses após a exposição ao PQ + MB e especialmente em animais “velhos” com 18 meses de idade (Thiruchelvam, McCormack *et al.*, 2003). Neste contexto, outros dados da literatura mostram que a suscetibilidade maior da SN seria apenas relacionada à própria sensibilidade dessa estrutura cerebral ao estresse oxidativo (McCormack, Atienza *et al.*, 2006) e não ao mecanismo mediado pelo DAT (Richardson, Quan *et al.*, 2005). Porém, ainda não se tem certeza de

qual é o mecanismo exato de toxicidade do PQ nos neurônios dopaminérgicos e como o MB poderia estar de fato contribuindo para este efeito. Considerando os resultados obtidos no protocolo *in vivo* de exposição aos pesticidas, parece que o aumento na vulnerabilidade dos camundongos machos adultos ao PQ + MB se deve à diminuição de neurônios dopaminérgicos após a primeira exposição no período PN de desenvolvimento. Entretanto, o papel do estriado não ficou totalmente claro, pois as alterações que foram observadas durante o desenvolvimento (redução na atividade dos complexos mitocondriais e diminuição de marcadores dopaminérgicos) estavam ausentes na vida adulta e, além disso, um segundo insulto não foi capaz de causar danos nesta estrutura. Porém não se pode descartar a hipótese de uma possível alteração no estriado dos animais adultos que pode ser tardia (animais “velhos”) em relação à SN como já mostrado em outros estudos (Thiruchelvam, McCormack *et al.*, 2003).

Nosso segundo objetivo geral foi investigar as alterações no sistema dopaminérgico desencadeadas por um processo inflamatório induzido pelo LPS durante o desenvolvimento, bem como determinar se essas alterações poderiam alterar a vulnerabilidade desse sistema a insultos ambientais subsequentes. A administração PN sistêmica de LPS, especialmente no dia PN 5 causou uma diminuição no peso corporal dos animais, que se manteve reduzido em relação ao controle até a vida adulta dos animais. Ao contrário dos resultados obtidos com a exposição PN aos pesticidas, o LPS foi capaz de induzir mortalidade e alterações comportamentais significativas sem distinção do sexo.

No teste do campo aberto, por exemplo, os animais apresentaram hiperatividade, dada pelo aumento no número de cruzamentos, bem como aumento na atividade exploratória. Fan e colaboradores mostraram um efeito semelhante em ratos administrados com LPS (i.c.v., dia PN 5), onde os animais apresentaram hiperatividade e redução no peso corporal em relação ao controle até por volta do dia PN 60 (Fan, Tien, Zheng *et al.*, 2011).

Além disso, foram observadas alterações comportamentais no *beam walking* e no *rotarod*, que medem coordenação motora e equilíbrio, bem como no *pole test*, que é utilizado para medir bradicinesia em modelos experimentais de DP. Resultados semelhantes nesses testes foram também encontrados no modelo de administração intracerebral de LPS no dia PN 5 em ratos (Fan, Tien, Zheng *et al.*, 2011). Esses resultados indicam que a exposição pós-natal ao LPS causou um déficit comportamental evidente, porém as alterações comportamentais não foram acompanhadas por alterações nos

parâmetros de estresse oxidativo e função mitocondrial, os quais não foram alterados no estriado dos camundongos.

Entretanto, a administração de LPS causou um aumento nos níveis de IL-6 e TNF- α no estriado dos camundongos machos, e um aumento somente nos níveis de TNF- α nas fêmeas. Dados prévios da literatura mostram que após exposição neonatal ao LPS uma resposta inflamatória similar foi observada em animais no dia PN 6 e no PN 21, e essa resposta inflamatória foi associada com disfunção neurológica nos animais (Cai, Pang *et al.*, 2003; Fan, Pang *et al.*, 2005). Além disso, em outro estudo, foi demonstrado que a resposta inflamatória após a exposição PN ao LPS persistiu até 65 dias após sua administração (Fan, Tien, Zheng *et al.*, 2011).

De acordo com a literatura, as alterações observadas nos animais expostos ao LPS posnatalmente, como o processo inflamatório e os déficits comportamentais voltam aos níveis do controle na vida adulta (Fan, Tien, Zheng *et al.*, 2011; Wang, Fan *et al.*, 2013). Nossos dados estão de acordo com a literatura, pois as alterações comportamentais evidenciadas no dia PN30 estavam ausentes nos animais adultos (4,5 meses; grupo exposto ao LPS posnatalmente e exposto a salina na vida adulta). Entretanto, quando esses animais, previamente administrados com LPS durante o desenvolvimento, foram expostos ao PQ + MB na vida adulta, houve déficit comportamental evidenciado pela diminuição no número de sucessos no *single pellet*, bem como aumento no número de resvaladas no *beam walking* nos camundongos machos. Esses dados sugerem que o processo inflamatório durante o desenvolvimento parece ter causado alterações importantes nos animais, pois quando são submetidos a um novo desafio na vida adulta, eles apresentam alterações comportamentais significativas, apesar de não podermos afirmar se essas alterações estão ou não relacionadas a uma possível neurodegeneração dopaminérgica (a quantificação das análises imunoistoquímicas para TH e DAT no protocolo do LPS ainda não foram finalizadas).

Como discutido anteriormente, o *single pellet* e o *beam walking* são testes que avaliam coordenação motora fina e podem estar relacionados a alterações mais sutis no sistema dopaminérgico. No grupo LPS + pesticidas houve déficit motor nos testes do *single pellet* e do *beam walking*, mas não no teste do *rotarod*. Com isso, poderíamos sugerir que os animais expostos ao insulto inflamatório PN, que foi capaz de induzir alterações comportamentais importantes durante o desenvolvimento, parecem apresentar alterações comportamentais mais sutis quando expostos ao segundo desafio na vida adulta, quando comparado ao protocolo de exposição pós-natal dos pesticidas. Os

camundongos previamente expostos aos pesticidas (período PN) e reexpostos a esses toxicantes na vida adulta apresentaram déficit comportamental no *rotarod*, o que indica um possível dano mais severo. Porém, somente poderemos sugerir esses achados após as análises imunoistoquímicas para os marcadores de neurônios dopaminérgicos (TH e DAT) nos grupos experimentais tratados com LPS.

Entretanto vale ressaltar que as alterações comportamentais foram mais uma vez observadas nos machos e não nas fêmeas. Como discutido anteriormente, existe uma diferença relacionada ao sexo que parece ser relevante não apenas nos indivíduos adultos, mas também durante o desenvolvimento. Neste cenário, o sistema imune parece ter um papel importante, pois estudos mostram uma diferença no desenvolvimento das células microgliais entre machos e fêmeas (Schwarz, Sholar *et al.*, 2012). No modelo do LPS PN, houve de fato um processo inflamatório significativo, que à princípio foi similar em machos e fêmeas, apesar das últimas apresentarem alterações apenas nos níveis de TNF- α no dia PN30. Entretanto, esses animais, que apresentaram alterações semelhantes após a exposição PN ao LPS, na vida adulta respondem de maneira diferente ao novo insulto tóxico, indicando uma possível diferença na resposta imunológica entre os sexos.

Por fim, no capítulo III foi investigado o efeito da exposição aos pesticidas em cultivos de células tronco neurais sobre parâmetros de proliferação e diferenciação celular, além de estresse oxidativo. O modelo de células tronco neurais utilizado no estudo é considerado uma valiosa ferramenta para estudar o efeito de toxicantes ambientais durante o desenvolvimento (Tofighi, Moors *et al.*, 2011; Ceccatelli, Bose *et al.*, 2013). Essas células, na presença de fatores de crescimento, permanecem num estado indiferenciado e proliferativo, uma característica de células progenitoras, possibilitando mimetizar *in vitro* períodos iniciais do desenvolvimento cerebral. Em nosso estudo, a exposição das células aos pesticidas causou uma diminuição na proliferação celular, especialmente o tratamento com PQ ou PQ + MB. Chang e colaboradores mostraram um efeito similar ao expor células troco neurais humanas ao PQ (Chang, Lu *et al.*, 2013).

Um dos principais fatores que afeta a proliferação celular é a interferência ou parada no ciclo celular. Em nosso estudo, focamos em algumas proteínas importantes na regulação do ciclo, principalmente na progressão da fase G1 para a S. A exposição ao PQ + MB causou uma diminuição na expressão do RNAm das ciclinas D1 e D2, importantes na fase G1 do ciclo. Além disso, os pesticidas, de uma maneira similar, induziram um aumento na expressão do RNAm da proteína pRb1 o que

acarreta em uma diminuição da proliferação celular, uma vez que a proteína pRb1 se liga ao fator de transcrição E2F1 impedindo que ocorra a transcrição de genes importantes para a progressão do ciclo (G1→S) (Kawauchi, Shikanai *et al.*, 2013). A redução na expressão das ciclinas D também é um fator importante na proliferação celular. Essas ciclinas formam complexos com proteínas cinases dependentes de ciclinas (complexo ciclina-Cdk), responsáveis pela fosforilação de pRb1, e consequente liberação da proteína E2F1 (Satyanarayana e Kaldis, 2009; Kawauchi, Shikanai *et al.*, 2013).

A inibição da proliferação celular pode estar relacionada a um mecanismo de senescência. A senescência celular refere-se basicamente a uma parada na proliferação celular. Pode ser fisiológica (no processo normal do envelhecimento, em que células param de se dividir) ou ainda ativada por meio de algum estresse celular como dano ao DNA, dano na cromatina e estresse oxidativo (Ransohoff e Perry, 2009; Guo, Chakraborty *et al.*, 2010). A proteína pRb é importante no mecanismo de senescência celular. Essa proteína, quando hipofosforilada e ativa, age como um potente repressor de genes importantes para a replicação do DNA, desta forma, causando parada no ciclo celular. Os inibidores de Cdk p16 e p21 agem em conjunto com pRb, pois inibem Cdk e assim impedem a fosforilação de pRb, permitindo que este último permaneça no seu estado ativo (inibindo a progressão do ciclo celular). Então, p21 e p16 são mediadores da parada no ciclo celular, sendo utilizados como marcadores de senescência (Ben-Porath e Weinberg, 2005). No presente estudo, não foram observadas modificações na expressão de p16 e p21. Porém, a expressão de pRb foi aumentada após a exposição aos pesticidas, sugerir que um possível mecanismo de senescência foi ativado.

Além disso, os pesticidas, tanto isolados como em combinação, foram capazes de aumentar a expressão do inibidor p19 (Sonzogni, Ogara *et al.*, 2014). O p19 é um membro da família Ink4 de inibidores de Cdk que incluem p16, p15 e p18. Todos os membros compartilham características estruturais e possuem a habilidade de se ligar e inibir os complexos ciclina D/Cdk4 ou Cdk6, contribuindo para a parada do ciclo celular em G1 (Hirai, Roussel *et al.*, 1995; Canepa, Scassa *et al.*, 2007). Os membros desta família são diferentemente expressos durante o desenvolvimento e parecem estarem envolvidos na regulação de diferentes eventos do ciclo como diferenciação e senescência. Recentemente, um estudo mostrou que o p19 participa no mecanismo celular que desencadeia a senescência e que sua indução parece ocorrer antes de outros marcadores clássicos como o p21 e p16 (Sonzogni,

Ogara *et al.*, 2014). Baseado nesses achados da literatura e em nossos dados, podemos sugerir que a diminuição na proliferação celular após a exposição aos pesticidas pode estar relacionada a um mecanismo de senescência celular.

Dados prévios mostram que o estresse oxidativo pode induzir paradas no ciclo celular, que podem ocorrer nas fases G1, S ou G2, bloqueando, desta forma, a proliferação celular (Shackelford, Kaufmann *et al.*, 2000; Guo, Chakraborty *et al.*, 2010). Essas paradas ocorrem para que, se possível, seja feito o reparo para que o ciclo possa então prosseguir de maneira adequada. As paradas podem ser transitórias ou permanentes, podendo, no último caso, levar a morte celular por apoptose ou necrose. Em nosso estudo, houve um aumento na geração de espécies reativas, especialmente após a exposição ao PQ. A literatura mostra que o efeito tóxico primário do PQ é pela geração de espécies reativas de oxigênio via seu ciclo redox, principalmente a geração de radical ânion superóxido (Day, Patel *et al.*, 1999). Resultados similares foram encontrados em um estudo recente, onde o PQ induziu estresse oxidativo e reduziu a proliferação celular em células progenitoras humanas (Chang, Lu *et al.*, 2013). A redução na proliferação celular foi atribuída ao aumento na expressão dos genes p53 e p21 (Chang, Lu *et al.*, 2013), importantes na regulação do ciclo celular e apoptose.

Nossos resultados indicam que os pesticidas podem agir de diferentes maneiras e em diversos alvos do ciclo celular alterando a proliferação celular. Entretanto, a exposição ao PQ e ao MB não alterou a diferenciação celular. Os marcadores de diferenciação neuronal Tuj1 e de células gliais GFAP permaneceram nos níveis do controle, indicando que os pesticidas parecem não afetar a diferenciação das células. Entretanto, não podemos afirmar com certeza que não existem diferenças entre as células expostas aos pesticidas e as células tratadas com veículo após a diferenciação. Isso porque apenas dois marcadores foram determinados (Tuj1 e GFAP) após a diferenciação e, além disso, alterações na suscetibilidade das células diferenciadas, que poderiam indicar uma possível mudança na resposta destas a insultos tóxicos, não foram avaliadas.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, podemos inferir que:

- A exposição pós-natal aos pesticidas PQ + MB não causou alterações motoras, bem como não foi capaz de induzir estresse oxidativo no estriado, porém alterou a função mitocondrial e diminuiu a imunomarcagem para TH e DAT no estriado, além de reduzir o número de neurônios TH⁺ e DAT⁺ na SN_{pc} dos camundongos machos;
- A diminuição nos neurônios TH⁺ e DAT⁺ na SN_{pc}, após a exposição PN aos pesticidas, parece estar relacionada a um possível mecanismo de *toxicidade silenciosa* tendo em vista os eventos observados na vida adulta (após um segundo desafio neurotóxico);
- Camundongos machos expostos ao PQ + MB posnatalmente parecem ser mais suscetíveis que as fêmeas a uma segunda exposição aos mesmos pesticidas na vida adulta nos testes comportamentais;
- Camundongos machos expostos ao PQ + MB no período PN são mais sensíveis que as fêmeas à perda de neurônios dopaminérgicos na SN induzida pela segunda exposição aos pesticidas na vida adulta;
- A exposição PN ao LPS induziu alterações motoras nos animais, sem causar modificação nos parâmetros de estresse oxidativo e função mitocondrial no estriado;
- O processo inflamatório induzido pela exposição PN ao LPS parece ser importante nas alterações comportamentais evidenciadas;
- Camundongos expostos ao LPS posnatalmente também parecem ser mais suscetíveis à exposição ao PQ + MB na vida adulta nos testes do *beam walking* e *single pellet*;
- De uma maneira geral, os camundongos machos foram mais sensíveis à exposição aos pesticidas na vida adulta em relação às fêmeas.
- A exposição ao PQ + MB diminuiu a proliferação de células tronco neurais por um mecanismo relacionado à inibição da progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular.
- A exposição ao PQ + MB em células tronco neurais parece ativar mecanismos de senescência celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H., S. R. Wyss, *et al.* Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. **Eur J Biochem**, v.48, n.1, Oct 1, p.137-45. 1974.
- Aguiar, A. S., Jr., S. C. Lopes, *et al.* Exercise Improves Cognitive Impairment and Dopamine Metabolism in MPTP-Treated Mice. **Neurotox Res**, v. 29, n.1, Oct., 118-25, 2015.
- Ali, S. F., C. P. Lebel, *et al.* Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v.13, n.3, Fall, p.637-48. 1992.
- Altemus, M., N. Sarvaiya, *et al.* Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. **Front Neuroendocrinol**, v.35, n.3, Aug, p.320-30. 2014.
- Alzheimer's, A. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, v.10, n.2, Mar, p.e47-92. 2014.
- Andersen, J. K. Iron dysregulation and Parkinson's disease. **J Alzheimers Dis**, v.6, n.6 Suppl, Dec, p.S47-52. 2004.
- ANVISA - Agência nacional de vigilância sanitária; UFPR, 2012. Seminário Mercado de agronegócio e regulação, Brasília.
- Aras, S., G. Tanriover, *et al.* The role of nitric oxide on visual-evoked potentials in MPTP-induced Parkinsonism in mice. **Neurochem Int**, v.72, Jun, p.48-57. 2014.
- Baldereschi, M., A. Di Carlo, *et al.* Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. **Neurology**, v.55, n.9, Nov 14, p.1358-63. 2000.
- Baltazar, M. T., R. J. Dinis-Oliveira, *et al.* Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases-A mechanistic approach. **Toxicol Lett**, Feb 3. 2014.

Barcia, C., C. M. Ros, *et al.* IFN-gamma signaling, with the synergistic contribution of TNF-alpha, mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. **Cell Death Dis**, v.2, p.e142. 2011.

Barlow, B. K., D. W. Lee, *et al.* Modulation of antioxidant defense systems by the environmental pesticide maneb in dopaminergic cells. **Neurotoxicology**, v.26, n.1, Jan, p.63-75. 2005.

Barlow, B. K., E. K. Richfield, *et al.* A fetal risk factor for Parkinson's disease. **Dev Neurosci**, v.26, n.1, Jan-Feb, p.11-23. 2004.

Barlow, B. K., M. J. Thiruchelvam, *et al.* Increased synaptosomal dopamine content and brain concentration of paraquat produced by selective dithiocarbamates. **J Neurochem**, v.85, n.4, May, p.1075-86. 2003.

Barnham, K. J., C. L. Masters, *et al.* Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nat Rev Drug Discov**, v.3, n.3, Mar, p.205-14. 2004.

Barouki, R., P. D. Gluckman, *et al.* Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. **Environ Health**, v.11, p.42. 2012.

Ben-Porath, I. e R. A. Weinberg. The signals and pathways activating cellular senescence. **Int J Biochem Cell Biol**, v.37, n.5, May, p.961-76. 2005.

Berry, C., C. La Vecchia, *et al.* Paraquat and Parkinson's disease. **Cell Death Differ**, v.17, n.7, Jul, p.1115-25. 2010.

Bilbo, S. D. e J. M. Schwarz. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. **Front Behav Neurosci**, v.3, p.14. 2009.

Bilbo, S.D. e J.m. Schwartz. The immune system and developmental programming of brain and behavior. **Front Neuroendocrinol**, v.33, n.3, Aug, p.267-86. 2012.

Blandini, F., G. Nappi, *et al.* Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v.62, n.1, Sep, p.63-88. 2000.

Boka, G., P. Anglade, *et al.* Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v.172, n.1-2, May 19, p.151-4. 1994.

Bolton, J. L. e S. D. Bilbo. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. **Dialogues Clin Neurosci**, v.16, n.3, Sep, p.307-20. 2014.

Bose, R., M. Moors, *et al.* Glucocorticoids induce long-lasting effects in neural stem cells resulting in senescence-related alterations. **Cell Death Dis**, v.1, p.e92. 2010.

Braak, H., E. Ghebremedhin, *et al.* Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res**, v.318, n.1, Oct, p.121-34. 2004.

Breckenridge, C. B., N. C. Sturgess, *et al.* Pharmacokinetic, neurochemical, stereological and neuropathological studies on the potential effects of paraquat in the substantia nigra pars compacta and striatum of male C57BL/6J mice. **Neurotoxicology**, v.37, Jul, p.1-14. 2013.

Brooks, S. P. e S. B. Dunnett. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. **Nat Rev Neurosci**, v.10, n.7, Jul, p.519-29. 2009.

Brown, T. P., P. C. Rumsby, *et al.* Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? **Environ Health Perspect**, v.114, n.2, Feb, p.156-64. 2006.

Cai, Z., Y. Pang, *et al.* Differential roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. **Brain Res**, v.975, n.1-2, Jun 13, p.37-47. 2003.

Calderbank, A. The bipyridylum herbicides. **Adv Pest Control Res**, v.8, p.127-235. 1968.

Canepa, E. T., M. E. Scassa, *et al.* INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. **IUBMB Life**, v.59, n.7, Jul, p.419-26. 2007.

Carlberg, I. e B. Mannervik. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v.113, p.484-90. 1985.

Carneiro, F.F., R.M. Rigotto *et al.* Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre o impacto dos agrotóxicos na saúde. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Rio de Janeiro / São Paulo, 2015. Editora Expressão Popular.

Carvey, P. M., A. Punati, *et al.* Progressive dopamine neuron loss in Parkinson's disease: the multiple hit hypothesis. **Cell Transplant**, v.15, n.3, p.239-50. 2006.

Cassina, A. e R. Radi. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Arch Biochem Biophys**, v.328, n.2, Apr 15, p.309-16. 1996.

Castano, A., A. J. Herrera, *et al.* Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. **J Neurochem**, v.70, n.4, Apr, p.1584-92. 1998.

Ceccatelli, S., R. Bose, *et al.* Long-lasting neurotoxic effects of exposure to methylmercury during development. **J Intern Med**, v.273, n.5, May, p.490-7. 2013.

Chang, X., W. Lu, *et al.* Paraquat inhibits cell viability via enhanced oxidative stress and apoptosis in human neural progenitor cells. **Chem Biol Interact**, v.206, n.2, Nov 25, p.248-55. 2013.

Chen, C. C., A. Gilmore, *et al.* Study motor skill learning by single-pellet reaching tasks in mice. **J Vis Exp**, n.85. 2014.

Chen, Y., S. Zhang, *et al.* Transport of paraquat by human organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion family. **J Pharmacol Exp Ther**, v.322, n.2, Aug, p.695-700. 2007.

Cocheme, H. M. e M. P. Murphy. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. **J Biol Chem**, v.283, n.4, Jan 25, p.1786-98. 2008.

Colle, D., D. B. Santos, *et al.* Probucol increases striatal glutathione peroxidase activity and protects against 3-nitropropionic acid-induced pro-oxidative damage in rats. **PLoS One**, v.8, n.6, p.e67658. 2013.

Corasaniti, M. T., R. Defilippo, *et al.* Evidence that paraquat is able to cross the blood-brain barrier to a different extent in rats of various age. **Funct Neurol**, v.6, n.4, Oct-Dec, p.385-91. 1991.

Corasaniti, M. T., M. C. Strongoli, *et al.* Distribution of paraquat into the brain after its systemic injection in rats. **Funct Neurol**, v.7, n.1, Jan-Feb, p.51-6. 1992.

Corti, O., S. Lesage, *et al.* What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. **Physiol Rev**, v.91, n.4, Oct, p.1161-1218. 2011.

Cory-Slechta, D. A. Studying toxicants as single chemicals: does this strategy adequately identify neurotoxic risk? **Neurotoxicology**, v.26, n.4, Aug, p.491-510. 2005.

Cory-Slechta, D. A., M. Thiruchelvam, *et al.* Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype. **Environ Health Perspect**, v.113, n.9, Sep, p.1263-70. 2005.

Costa, L. G., M. Aschner, *et al.* Developmental neuropathology of environmental agents. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.44, p.87-110. 2004.

Costello, S., M. Cockburn, *et al.* Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. **Am J Epidemiol**, v.169, n.8, Apr 15, p.919-26. 2009.

Cristovao, A. C., D. H. Choi, *et al.* The role of NADPH oxidase 1-derived reactive oxygen species in paraquat-mediated dopaminergic cell death. **Antioxid Redox Signal**, v.11, n.9, Sep, p.2105-18. 2009.

Dahl, D. R. e F. E. Samson, Jr. Metabolism of rat brain mitochondria during postnatal development. **Am J Physiol**, v.196, n.2, Feb, p.470-2. 1959.

Day, B. J., M. Patel, *et al.* A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.22, Oct 26, p.12760-5. 1999.

Dexter, D. T., C. J. Carter, *et al.* Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. **J Neurochem**, v.52, n.2, Feb, p.381-9. 1989.

Dexter, D. T., A. E. Holley, *et al.* Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. **Mov Disord**, v.9, n.1, Jan, p.92-7. 1994.

Dinis-Oliveira, R. J., F. Remiao, *et al.* Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v.27, n.6, Dec, p.1110-22. 2006.

Drechsel, D. A. e M. Patel. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med**, v.44, n.11, Jun 1, p.1873-86. 2008.

Duke, D. C., L. B. Moran, *et al.* The medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease: mRNA profiles associated with higher brain tissue vulnerability. **Neurogenetics**, v.8, n.2, Apr, p.83-94. 2007.

Dutta, G., P. Zhang, *et al.* The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. **Fundam Clin Pharmacol**, v.22, n.5, Oct, p.453-64. 2008.

Elbaz, A., J. Clavel, *et al.* Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. **Ann Neurol**, v.66, n.4, Oct, p.494-504. 2009.

Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v.82, n.1, May, p.70-7. 1959.

Erecinska, M., S. Cherian, *et al.* Energy metabolism in mammalian brain during development. **Prog Neurobiol**, v.73, n.6, Aug, p.397-445. 2004.

Fan, L. W., Y. Pang, *et al.* Minocycline attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. **Neuroscience**, v.133, n.1, p.159-68. 2005.

Fan, L. W., L. T. Tien, *et al.* Neonatal exposure to lipopolysaccharide enhances vulnerability of nigrostriatal dopaminergic neurons to rotenone neurotoxicity in later life. **Neurobiol Dis**, v.44, n.3, Dec, p.304-16. 2011.

Fan, L.W., L.T. Tien, *et al.* Dopaminergic neuronal injury in the adult rat brain following neonatal exposure to lipopolysaccharide and the silent neurotoxicity. **Brain Behav Immun**, v.25, n.2, Feb, p.286-97. 2011.

Ferrari, C. C. e R. Tarelli. Parkinson's disease and systemic inflammation. **Parkinsons Dis**, v.2011, p.436813. 2011.

Ferraz, H. B., P. H. Bertolucci, *et al.* Chronic exposure to the fungicide maneb may produce symptoms and signs of CNS manganese intoxication. **Neurology**, v.38, n.4, Apr, p.550-3. 1988.

Fischer, J. C., W. Ruitenbeek, *et al.* Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin Chim Acta**, v.153, n.1, Nov 29, p.23-36. 1985.

Freire, C. e S. Koifman. Pesticide exposure and Parkinson's disease: epidemiological evidence of association. **Neurotoxicology**, v.33, n.5, Oct, p.947-71. 2012.

Garay, P. A. e A. K. Mcallister. Novel roles for immune molecules in neural development: implications for neurodevelopmental disorders. **Front Synaptic Neurosci**, v.2, p.136. 2010.

Gasser, P. J., M. Orchinik, *et al.* Distribution of organic cation transporter 3, a corticosterone-sensitive monoamine transporter, in the rat brain. **J Comp Neurol**, v.512, n.4, Feb 1, p.529-55. 2009.

Gillies, G. E., I. S. Pienaar, *et al.* Sex differences in Parkinson's disease. **Front Neuroendocrinol**, v.35, n.3, Aug, p.370-84. 2014.

Godfrey, K. M. e D. J. Barker. Fetal programming and adult health. **Public Health Nutr**, v.4, n.2B, Apr, p.611-24. 2001.

Goetz, C. G. Jean-Martin Charcot and the aging brain. **Arch Neurol**, v.59, n.11, Nov, p.1821-4. 2002.

Graham, D. G. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. **Mol Pharmacol**, v.14, n.4, Jul, p.633-43. 1978.

Guo, Y. L., S. Chakraborty, *et al.* Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence, and self-renewal. **Stem Cells Dev**, v.19, n.9, Sep, p.1321-31. 2010.

Hagan, J. J., D. N. Middlemiss, *et al.* Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. **Trends Pharmacol Sci**, v.18, n.5, May, p.156-63. 1997.

Hagberg, H., P. Gressens, *et al.* Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. **Ann Neurol**, v.71, n.4, Apr, p.444-57. 2012.

Hagberg, H., C. Mallard, *et al.* Mitochondria: hub of injury responses in the developing brain. **Lancet Neurol**, v.13, n.2, Feb, p.217-32. 2014.

Hanamsagar, R. e S. D. Bilbo. Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: Focus on microglial function and neuroinflammation during development. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Oct 12. 2015.

He, X. J., K. Uchida, *et al.* Dietary curcumin supplementation attenuates 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in C57BL mice. **J Toxicol Pathol**, v.28, n.4, Oct, p.197-206. 2015.

Heindel, J. J. Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of reproductive disease and dysfunction. **Semin Reprod Med**, v.24, n.3, Jul, p.168-77. 2006.

Heller, J., I. Dogan, *et al.* Evidence for gender differences in cognition, emotion and quality of life in Parkinson's disease? **Aging Dis**, v.5, n.1, Feb, p.63-75. 2014.

Herrera, A. J., A. Castano, *et al.* The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. **Neurobiol Dis**, v.7, n.4, Aug, p.429-47. 2000.

Hirai, H., M. F. Roussel, *et al.* Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. **Mol Cell Biol**, v.15, n.5, May, p.2672-81. 1995.

Hunot, S., F. Boissiere, *et al.* Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. **Neuroscience**, v.72, n.2, May, p.355-63. 1996.

Iravani, M. M., C. C. Leung, *et al.* The acute and the long-term effects of nigral lipopolysaccharide administration on dopaminergic dysfunction and glial cell activation. **Eur J Neurosci**, v.22, n.2, Jul, p.317-30. 2005.

Iravani, M. M., M. Sadeghian, *et al.* Lipopolysaccharide-induced nigral inflammation leads to increased IL-1 β tissue content and expression of astrocytic glial cell line-derived neurotrophic factor. **Neurosci Lett**, v.510, n.2, Feb 29, p.138-42. 2012.

Jang, H., D. A. Boltz, *et al.* Viral parkinsonism. **Biochim Biophys Acta**, v.1792, n.7, Jul, p.714-21. 2009.

Jenner, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v.53 Suppl 3, p.S26-36; discussion S36-8. 2003.

Kang, M. J., S. J. Gil, *et al.* Paraquat induces alternation of the dopamine catabolic pathways and glutathione levels in the substantia nigra of mice. **Toxicol Lett**, v.188, n.2, Jul 24, p.148-52. 2009.

Kawauchi, T., M. Shikanai, *et al.* Extra-cell cycle regulatory functions of cyclin-dependent kinases (CDK) and CDK inhibitor proteins contribute to brain development and neurological disorders. **Genes Cells**, v.18, n.3, Mar, p.176-94. 2013.

Khariv, V., K. Pang, *et al.* Toll-like receptor 9 deficiency impacts sensory and motor behaviors. **Brain Behav Immun**, v.32, Aug, p.164-72. 2013.

Land, J. M., R. F. Booth, *et al.* Development of mitochondrial energy metabolism in rat brain. **Biochem J**, v.164, n.2, May 15, p.339-48. 1977.

Langston, J. W. e P. A. Ballard, Jr. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. **N Engl J Med**, v.309, n.5, Aug 4, p.310. 1983.

Latini, A., C. G. Da Silva, *et al.* Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. **Mol Genet Metab**, v.86, n.1-2, Sep-Oct, p.188-99. 2005.

Lesage, S. e A. Brice. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. **Hum Mol Genet**, v.18, n.R1, Apr 15, p.R48-59. 2009.

Lewitt, P. A. Levodopa therapy for Parkinson's disease: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Mov Disord**, v.30, n.1, Jan, p.64-72. 2015.

Ling, Z., Q. A. Chang, *et al.* Rotenone potentiates dopamine neuron loss in animals exposed to lipopolysaccharide prenatally. **Exp Neurol**, v.190, n.2, Dec, p.373-83. 2004.

Ling, Z., D. A. Gayle, *et al.* In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. **Mov Disord**, v.17, n.1, Jan, p.116-24. 2002.

Liou, H. H., M. C. Tsai, *et al.* Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. **Neurology**, v.48, n.6, Jun, p.1583-8. 1997.

Liu, B., J. W. Jiang, *et al.* Systemic infusion of naloxone reduces degeneration of rat substantia nigral dopaminergic neurons induced by intranigral injection of lipopolysaccharide. **J Pharmacol Exp Ther**, v.295, n.1, Oct, p.125-32. 2000.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, n.1, Nov, p.265-75. 1951.

Lu, X., G. Bing, *et al.* Naloxone prevents microglia-induced degeneration of dopaminergic substantia nigra neurons in adult rats. **Neuroscience**, v.97, n.2, p.285-91. 2000.

Luchtman, D. W., Q. Meng, *et al.* Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease. **Behav Brain Res**, v.226, n.2, Jan 15, p.386-96. 2012.

Mandel, J. S., H. O. Adami, *et al.* Paraquat and Parkinson's disease: an overview of the epidemiology and a review of two recent studies. **Regul Toxicol Pharmacol**, v.62, n.2, Mar, p.385-92. 2012.

Mandy, W., R. Chilvers, *et al.* Sex differences in autism spectrum disorder: evidence from a large sample of children and adolescents. **J Autism Dev Disord**, v.42, n.7, Jul, p.1304-13. 2012.

Manning-Bog, A. B., A. L. McCormack, *et al.* The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. **J Biol Chem**, v.277, n.3, Jan 18, p.1641-4. 2002.

Mcarthur, S. e G. E. Gillies. Peripheral vs. Central Sex Steroid Hormones in Experimental Parkinson's Disease. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v.2, p.82. 2011.

Mccormack, A. L., J. G. Atienza, *et al.* Decreased susceptibility to oxidative stress underlies the resistance of specific dopaminergic cell populations to paraquat-induced degeneration. **Neuroscience**, v.141, n.2, Aug 25, p.929-37. 2006.

Mccormack, A. L., M. Thiruchelvam, *et al.* Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. **Neurobiol Dis**, v.10, n.2, Jul, p.119-27. 2002.

Mcgeer, P. L., S. Itagaki, *et al.* Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v.38, n.8, Aug, p.1285-91. 1988.

Misra, H. P. e I. Fridovich. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v.247, n.10, May 25, p.3170-5. 1972.

Mitra, S., N. Chakrabarti, *et al.* Differential regional expression patterns of alpha-synuclein, TNF-alpha, and IL-1beta; and variable status of dopaminergic neurotoxicity in mouse brain after Paraquat treatment. **J Neuroinflammation**, v.8, p.163. 2011.

Modgil, S., D. K. Lahiri, *et al.* Role of early life exposure and environment on neurodegeneration: implications on brain disorders. **Transl Neurodegener**, v.3, p.9. 2014.

Mogi, M., M. Harada, *et al.* Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. **Neurosci Lett**, v.180, n.2, Oct 24, p.147-50. 1994.

Monville, C., E. M. Torres, *et al.* Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. **J Neurosci Methods**, v.158, n.2, Dec 15, p.219-23. 2006.

Morato, G. S., T. Lemos, *et al.* Acute exposure to maneb alters some behavioral functions in the mouse. **Neurotoxicol Teratol**, v.11, n.5, Sep-Oct, p.421-5. 1989.

Moretto, A. e C. Colosio. Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v.32, n.4, Aug, p.383-91. 2011.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, n.1-2, Dec 16, p.55-63. 1983.

Mount, M. P., A. Lira, *et al.* Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. **J Neurosci**, v.27, n.12, Mar 21, p.3328-37. 2007.

Murakami, S., I. Miyazaki, *et al.* Neuroprotective effects of metallothionein against rotenone-induced myenteric neurodegeneration in parkinsonian mice. **Neurotox Res**, v.26, n.3, Oct, p.285-98. 2014.

Naylor, J. L., P. S. Widdowson, *et al.* Further evidence that the blood/brain barrier impedes paraquat entry into the brain. **Hum Exp Toxicol**, v.14, n.7, Jul, p.587-94. 1995.

Nehlig, A., A. P. De Vasconcelos, *et al.* Quantitative autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development. **J Neurosci**, v.8, n.7, Jul, p.2321-33. 1988.

Ohkawa, H., N. Ohishi, *et al.* Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v.95, n.2, Jun, p.351-8. 1979.

Olanow, C. W., D. P. Perl, *et al.* Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. **Lancet Neurol**, v.3, n.8, Aug, p.496-503. 2004.

Ossig, C. e H. Reichmann. Treatment strategies in early and advanced Parkinson disease. **Neurol Clin**, v.33, n.1, Feb, p.19-37. 2015.

Packard, M. G. e B. J. Knowlton. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. **Annu Rev Neurosci**, v.25, p.563-93. 2002.

Pan-Montojo, F. e H. Reichmann. Considerations on the role of environmental toxins in idiopathic Parkinson's disease pathophysiology. **Transl Neurodegener**, v.3, p.10. 2014.

Park, G., Y. J. Park, *et al.* Ropinirole protects against 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced neurotoxicity in mice via anti-apoptotic mechanism. **Pharmacol Biochem Behav**, v.104, Mar, p.163-8. 2013.

Parkinson, J. An essay on the shaking palsy. 1817. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v.14, n.2, Spring, p.223-36; discussion 222. 2002.

Peng, J., F. F. Stevenson, *et al.* Iron-enhanced paraquat-mediated dopaminergic cell death due to increased oxidative stress as a consequence of microglial activation. **Free Radic Biol Med**, v.46, n.2, Jan 15, p.312-20. 2009.

Perry, V. H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. **Brain Behav Immun**, v.18, n.5, Sep, p.407-13. 2004.

Perry, V.H. Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. **Acta Neuropathol**, v.120, n.3, Sep, p.277-86. 2010.

Perry, V. H., J. A. Nicoll, *et al.* Microglia in neurodegenerative disease. **Nat Rev Neurol**, v.6, n.4, Apr, p.193-201. 2010.

Petrovitch, H., G. W. Ross, *et al.* Plantation work and risk of Parkinson disease in a population-based longitudinal study. **Arch Neurol**, v.59, n.11, Nov, p.1787-92. 2002.

Pioli, E. Y., W. Meissner, *et al.* Differential behavioral effects of partial bilateral lesions of ventral tegmental area or substantia nigra pars compacta in rats. **Neuroscience**, v.153, n.4, Jun 2, p.1213-24. 2008.

Pisa, M. Motor functions of the striatum in the rat: critical role of the lateral region in tongue and forelimb reaching. **Neuroscience**, v.24, n.2, Feb, p.453-63. 1988.

Plowman, E. K., N. Maling, *et al.* Differential sensitivity of cranial and limb motor function to nigrostriatal dopamine depletion. **Behav Brain Res**, v.237, Jan 15, p.157-63. 2013.

Prasad, K., E. Tarasewicz, *et al.* Toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat accumulation in mouse brain. **Exp Neurol**, v.215, n.2, Feb, p.358-67. 2009.

Pringsheim, T., N. Jette, *et al.* The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Mov Disord**, v.29, n.13, Nov, p.1583-90. 2014.

Purisai, M. G., A. L. McCormack, *et al.* Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. **Neurobiol Dis**, v.25, n.2, Feb, p.392-400. 2007.

Quinn, L. P., M. J. Perren, *et al.* A beam-walking apparatus to assess behavioural impairments in MPTP-treated mice: pharmacological validation with R-(-)-deprenyl. **J Neurosci Methods**, v.164, n.1, Aug 15, p.43-9. 2007.

Rail, D., C. Scholtz, *et al.* Post-encephalitic Parkinsonism: current experience. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.44, n.8, Aug, p.670-6. 1981.

Ransohoff, R. M. e V. H. Perry. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annu Rev Immunol**, v.27, p.119-45. 2009.

Rappold, P. M., M. Cui, *et al.* Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.108, n.51, Dec 20, p.20766-71. 2011.

Reinert, K. R., C. D. Umphlet, *et al.* Short-term effects of an endotoxin on substantia nigra dopamine neurons. **Brain Res**, v.1557, Apr 4, p.164-70. 2014.

Reuhl, K. R. Delayed expression of neurotoxicity: the problem of silent damage. **Neurotoxicology**, v.12, n.3, Fall, p.341-6. 1991.

Rice, D. e S. Barone, Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect**, v.108 Suppl 3, Jun, p.511-33. 2000.

Richardson, J. R., Y. Quan, *et al.* Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. **Toxicol Sci**, v.88, n.1, Nov, p.193-201. 2005.

Riederer, P. e S. Wuketich. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. **J Neural Transm**, v.38, n.3-4, p.277-301. 1976.

Rodier, P. M. Developing brain as a target of toxicity. **Environ Health Perspect**, v.103 Suppl 6, Sep, p.73-6. 1995.

Rosa, R., C. Sanfeliu, *et al.* The mechanism for hexachlorocyclohexane-induced cytotoxicity and changes in intracellular Ca²⁺ homeostasis in cultured cerebellar granule neurons is different for the gamma- and delta-isomers. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.142, n.1, Jan, p.31-9. 1997.

Santos, D. B., K. C. Peres, *et al.* Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid beta peptide in mice. **Exp Neurol**, v.233, n.2, Feb, p.767-75. 2012.

Satyanarayana, A. e P. Kaldis. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdk's, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. **Oncogene**, v.28, n.33, Aug 20, p.2925-39. 2009.

Schapira, A. H., J. M. Cooper, *et al.* Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **J Neurochem**, v.54, n.3, Mar, p.823-7. 1990.

Schmitz, A. E., P. A. De Oliveira, *et al.* Interaction of curcumin with manganese may compromise metal and neurotransmitter homeostasis in the hippocampus of young mice. **Biol Trace Elem Res**, v.158, n.3, Jun, p.399-409. 2014.

Scholzen, T. e J. Gerdes. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol**, v.182, n.3, Mar, p.311-22. 2000.

Schulz-Schaeffer, W. J. Neurodegeneration in Parkinson disease: moving Lewy bodies out of focus. **Neurology**, v.79, n.24, Dec 11, p.2298-9. 2012.

Schulz-Schaeffer, W.J. Is Cell Death Primary or Secondary in the Pathophysiology of Idiopathic Parkinson's Disease? **Biomolecules**, v.5, n.3, p.1467-79. 2015.

Schwarz, J. M., P. W. Sholar, *et al.* Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. **J Neurochem**, v.120, n.6, Mar, p.948-63. 2012.

Shackelford, R. E., W. K. Kaufmann, *et al.* Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. **Free Radic Biol Med**, v.28, n.9, May 1, p.1387-404. 2000.

Shastri, B. S. Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. **Neurosci Res**, v.41, n.1, Sep, p.5-12. 2001.

Shimizu, K., K. Ohtaki, *et al.* Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. **Brain Res**, v.906, n.1-2, Jul 6, p.135-42. 2001.

Sian, J., D. T. Dexter, *et al.* Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. **Ann Neurol**, v.36, n.3, Sep, p.348-55. 1994.

SINDAG - Sindicato nacional da indústria de produtos para defesa agrícola, 2012. Dados básicos, São Paulo.

Sidhu, A., C. Wersinger, *et al.* Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? **FASEB J**, v.18, n.6, Apr, p.637-47. 2004.

Singh, N., V. Pillay, *et al.* Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v.81, n.1, Jan, p.29-44. 2007.

Sofic, E., K. W. Lange, *et al.* Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v.142, n.2, Aug 17, p.128-30. 1992.

Solla, P., A. Cannas, *et al.* Gender differences in motor and non-motor symptoms among Sardinian patients with Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, v.323, n.1-2, Dec 15, p.33-9. 2012.

Song, C., A. Kanthasamy, *et al.* Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration. **Mol Pharmacol**, v.77, n.4, Apr, p.621-32. 2010.

Sonzogni, S. V., M. F. Ogara, *et al.* p19INK4d is involved in the cellular senescence mechanism contributing to heterochromatin formation. **Biochim Biophys Acta**, v.1840, n.7, Jul, p.2171-83. 2014.

Sprenger, F. e W. Poewe. Management of motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease. **CNS Drugs**, v.27, n.4, Apr, p.259-72. 2013.

Stanley, J. L., R. J. Lincoln, *et al.* The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. **J Psychopharmacol**, v.19, n.3, May, p.221-7. 2005.

Takahashi, R. N., R. Rogerio, *et al.* Maneb enhances MPTP neurotoxicity in mice. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, v.66, n.1, Oct, p.167-70. 1989.

Tamm, C., J. Duckworth, *et al.* High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation. **J Neurochem**, v.97, n.1, Apr, p.69-78. 2006.

Tanner, C. M., F. Kamel, *et al.* Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environ Health Perspect**, v.119, n.6, Jun, p.866-72. 2011.

Tanner, C. M. e J. W. Langston. Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review. **Neurology**, v.40, n.10 Suppl 3, Oct, p.suppl 17-30; discussion 30-1. 1990.

Tanner, C. M., G. W. Ross, *et al.* Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study. **Arch Neurol**, v.66, n.9, Sep, p.1106-13. 2009.

Tansey, M. G., M. K. McCoy, *et al.* Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. **Exp Neurol**, v.208, n.1, Nov, p.1-25. 2007.

Taylor, J. M., B. S. Main, *et al.* Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. **Neurochem Int**, v.62, n.5, Apr, p.803-19. 2013.

Taylor, K. S., J. A. Cook, *et al.* Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.78, n.8, Aug, p.905-6. 2007.

Temple, S. The development of neural stem cells. **Nature**, v.414, n.6859, Nov 1, p.112-7. 2001.

Thiruchelvam, M., B. J. Brockel, *et al.* Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? **Brain Res**, v.873, n.2, Aug 11, p.225-34. 2000.

Thiruchelvam, M., A. McCormack, *et al.* Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. **Eur J Neurosci**, v.18, n.3, Aug, p.589-600. 2003.

Thiruchelvam, M., E. K. Richfield, *et al.* The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat

and maneb: implications for Parkinson's disease. **J Neurosci**, v.20, n.24, Dec 15, p.9207-14. 2000.

Thiruchelvam, M, E.K. Richfield, *et al.* Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype. **Neurotoxicology**, v.23, n.4-5, Oct, p.621-33. 2002.

Tien, L. T., A. Kaizaki, *et al.* Neonatal exposure to lipopolysaccharide enhances accumulation of alpha-synuclein aggregation and dopamine transporter protein expression in the substantia nigra in responses to rotenone challenge in later life. **Toxicology**, v.308, Jun 7, p.96-103. 2013.

Todorova, A., P. Jenner, *et al.* Non-motor Parkinson's: integral to motor Parkinson's, yet often neglected. **Pract Neurol**, v.14, n.5, Oct, p.310-22. 2014.

Tofighi, R., M. Moors, *et al.* Neural stem cells for developmental neurotoxicity studies. **Methods Mol Biol**, v.758, p.67-80. 2011.

Van Der Mark, M., R. Vermeulen, *et al.* Occupational exposure to pesticides and endotoxin and Parkinson disease in the Netherlands. **Occup Environ Med**, v.71, n.11, Nov, p.757-64. 2014.

Wang, K. C., L. W. Fan, *et al.* Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. **Neuroscience**, v.234, Mar 27, p.146-57. 2013.

Wendel, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v.77, p.325-33. 1981.

Wesseling, C., B. Van Wendel De Joode, *et al.* Paraquat in developing countries. **Int J Occup Environ Health**, v.7, n.4, Oct-Dec, p.275-86. 2001.

Yang, W. e E. Tiffany-Castiglioni. The bipyridyl herbicide paraquat produces oxidative stress-mediated toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: relevance to the dopaminergic pathogenesis. **J Toxicol Environ Health A**, v.68, n.22, Nov 26, p.1939-61. 2005.

Yavich, L., H. Tanila, *et al.* Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. **J Neurosci**, v.24, n.49, Dec 8, p.11165-70. 2004.

Zhang, J., V. A. Fitsanakis, *et al.* Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction. **J Neurochem**, v.84, n.2, Jan, p.336-46. 2003.

Ziemssen, T. e H. Reichmann. Non-motor dysfunction in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v.13, n.6, Aug, p.323-32. 2007.

APÊNDICE A – Sequência dos primers utilizados nas análises de PCR quantitativo em tempo real.

Tabela I: Lista de primers.

| Nome do Primer | <i>Forward</i> | <i>Reverse</i> |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| CD1 | aagtagtggcatccgc | cccgctccctatactcag |
| Ccnd2 | ttacctggaccgtttcttgg | tgctcaatgaagtcgtgagg |
| CDKN2D | gacattctgcagtcgcacat | cacccaaaaggggtgagaaa |
| CDKN1C | cagacgtggcgactcaggac | ctcagagaccggctcagctc |
| Cdkn1a | acacgctcccagacgtagtt | agcaaagtatgcegtcgtct |
| Cdkn2a | ccagaagtgaagccaaggag | gtgcgggtatttgegtatct |
| E2F1 | gaccctgcagaacaaatggt | aateccctctgcactttcct |
| <i>Rb1</i> | cacgaatgcaaaagcagaaa | tggettacaaatcaccaca |
| GPx1 | atagaagccctgctgtccaa | gaaacegcctttctttaggc |
| CAT1 | acatggtctgggacttctgg | caagttttgatgccctgggt |
| SOD 1 | ccactgcaggacctcatttt | cacctttgcccagtcattct |
| GFAP | gttcgagaactccaggagca | ggaagcaacgtctgtgaggt |
| Tuj1 | cccgagggtcaag | cgcttgaacagctcctggat |

APÊNDICE B – Análise de variância com o fator sexo como variável independente – Protocolo experimental I.

Tabela II. Efeito sexo-dependente no protocolo experimental I – efeito do PQ + MB no período PN.

| Teste | Efeito do sexo | | Sig. |
|----------------------------|----------------------|------------|------|
| | Valor de F calculado | Valor de p | |
| Nº de Cruzamentos | 7,158 | 0,01 | s. |
| Nº de Levantadas | 2,044 | 0,158 | n.s. |
| Latência (rotarod) | 0,419 | 0,52 | n.s. |
| Latência (Beam walking) | 1,101 | 0,298 | n.s. |
| Nº Resvaladas | 16,255 | 0,00016 | s. |
| Latência (pole test) | 0,933 | 0,338 | n.s. |
| GPx | 0,109 | 0,745 | n.s. |
| GR | 0,25 | 0,623 | n.s. |
| Catalase | 1,169 | 0,296 | n.s. |
| SOD | 0,532 | 0,475 | n.s. |
| TBARS | 1,05 | 0,321 | n.s. |
| NPSH | 2,646 | 0,123 | n.s. |
| Complexo I | 0,004 | 0,95 | n.s. |
| Complexo II | 1,187 | 0,293 | n.s. |
| TNF- α | 0,053 | 0,82 | n.s. |
| IL-6 | 0,006 | 0,936 | n.s. |
| Neurônios TH ⁺ | 3,862 | 0,069 | n.s. |
| Neurônios DAT ⁺ | 3,51 | 0,082 | n.s. |
| TH estriado | 2,607 | 0,128 | n.s. |
| DAT estriado | 0,203 | 0,659 | n.s. |

Foi efetuada análise de variância com o fator sexo como variável independente. $p < 0,05$ foi considerado significativo. s: significativo; n.s: não significativo

APÊNDICE C – Análise de variância com o fator sexo como variável independente – Protocolo experimental II.

Tabela III. Efeito sexo-dependente no protocolo experimental II – efeito da reexposição ao PQ + MB nos animais adulto.

| Teste | Efeito do sexo | | Sig. |
|----------------------------|----------------------|------------|------|
| | Valor de F calculado | Valor de p | |
| Nº de Cruzamentos | 1,092 | 0,297 | n.s. |
| Latência (Beam walking) | 1,512 | 0,222 | n.s. |
| Nº Resvaladas | 0,865 | 0,354 | n.s. |
| Single Pellet | 5,808 | 0,0174 | s. |
| Complexo I | 5,907 | 0,018 | s. |
| Complexo II | 1,14 | 0,29 | n.s. |
| Neurônios TH ⁺ | 7,514 | 0,01 | s. |
| Neurônios DAT ⁺ | 1,531 | 0,225 | n.s. |
| TH Estriado | 0,498 | 0,485 | n.s. |
| TH DAT | 1,571 | 0,218 | n.s. |

Foi efetuada análise de variância com o fator sexo como variável independente. $p < 0,05$ foi considerado significativo. s: significativo; n.s: não significativo

APÊNDICE D – Análise de variância com o fator sexo como variável independente – Protocolo experimental III.

Tabela IV. Efeito sexo-dependente no protocolo experimental III – efeito do LPS no período PN.

| Teste | Efeito do sexo | | Sig. |
|-------------------------|----------------------|------------|------|
| | Valor de F calculado | Valor de p | |
| Nº de Cruzamentos | 1,596 | 0,212 | n.s. |
| Nº de Levantadas | 0,825 | 0,368 | n.s. |
| Latência (rotarod) | 0,509 | 0,479 | n.s. |
| Latência (Beam walking) | 1,531 | 0,221 | n.s. |
| Nº Resvaladas | 5,54 | 0,022 | s. |
| Latência (pole test) | 0,031 | 0,859 | n.s. |
| GPx | 0,03 | 0,998 | n.s. |
| GR | 0,366 | 0,554 | n.s. |
| Catalase | 0,853 | 0,368 | n.s. |
| SOD | 4,133 | 0,058 | n.s. |
| TBARS | 2,64 | 0,126 | n.s. |
| NPSH | 1,115 | 0,305 | n.s. |
| Complexo I | 3,5 | 0,079 | n.s. |
| Complexo II | 2,652 | 0,122 | n.s. |
| TNF- α | 0,059 | 0,811 | n.s. |
| IL-6 | 0,024 | 0,878 | n.s. |

Foi efetuada análise de variância com o fator sexo como variável independente. $p < 0,05$ foi considerado significativo. s: significativo; n.s: não significativo

APÊNDICE E – Análise de variância com o fator sexo como variável independente – Protocolo experimental IV.

Tabela V. Efeito sexo-dependente no protocolo experimental IV – efeito do LPS + Pesticidas nos animais adultos.

| Teste | Efeito do sexo | | Sig. |
|-------------------------|----------------------|------------|------|
| | Valor de F calculado | Valor de p | |
| Nº de Cruzamentos | 0,003 | 0,954 | n.s. |
| Latência (Beam walking) | 1,263 | 0,264 | n.s. |
| Nº Resvaladas | 0,06 | 0,806 | n.s. |
| Single Pellet | 0,635 | 0,426 | n.s. |
| Complexo I | 0,404 | 0,527 | n.s. |
| Complexo II | 0,076 | 0,783 | n.s. |

Foi efetuada análise de variância com o fator sexo como variável independente. $p < 0,05$ foi considerado significativo. s: significativo; n.s: não significativo